



TITLE:

有毒渦鞭毛藻Alexandrium属の分子分類に関する研究( Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

足立, 真佐雄

---

CITATION:

足立, 真佐雄. 有毒渦鞭毛藻Alexandrium属の分子分類に関する研究. 京都大学, 1994, 博士(農学)

ISSUE DATE:

1994-07-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3096540>

RIGHT:

②

# 有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属の 分子分類に関する研究

"Molecular identification of toxic dinoflagellates *Alexandrium*"

足立 真佐雄  
Masao Adachi

1 9 9 4



目	次	
第 1 章	序 論	1
第 2 章	分子生物学的手法による有毒渦鞭毛藻 <i>Alexandrium</i> 属の分子分類	7
第 1 節	ITSおよび5.8S rDNA領域のRFLP解析と その塩基配列の決定	9
第 2 節	<i>In situ</i> ハイブリダイゼーション法による DNAプローブの培養株への応用	33
第 3 節	摘 要	38
第 3 章	モノクローナル抗体による <i>Alexandrium</i> 属藻類識別	40
第 1 節	<i>Alexandrium</i> 属藻類識別のための モノクローナル抗体の作製	42
第 2 節	得られた抗体と培養株との反応性	51
第 3 節	抗体の現場試料への応用	68
第 4 節	摘 要	75
第 4 章	総 括	76
	Summary and Conclusions	80
	謝 辞	82
	参 考 文 献	83

## 第 1 章 序 論

水圏における、微細藻類の異常増殖による着色現象は“赤潮”と呼ばれ、古くからその発生の報告が記録されている(西川, 1900)。近年、陸上からの大量の都市・工業排水の海洋への流入、さらには内湾における養殖業の発展による自家汚染は、富栄養化を助長して微細藻類の異常発生を誘発し、世界各地において大きな社会問題になっている。その原因生物としては、ラフィド藻、珧藻、ハプト藻そして渦鞭毛藻など種類は多種であるが、このうち渦鞭毛藻は種類数・発生件数ともに最も多く、とりわけ有毒種が多いことから注目されている。中でも、渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属数種は赤潮を発生させるのみならず、サキシトキシンやゴニオトキシンをはじめとした強力な神経毒成分を産生することが知られており(Schatz et al., 1966)、現場海水中で非常に低密度で発生した場合においても、ホタテガイやムラサキガイなどの二枚貝がこれらの藻類を摂取することにより毒化する(岩手県水試, 1993)。このような有毒渦鞭毛藻の摂取による二枚貝の毒化現象は、1975年以来三陸沿岸や北海道噴火湾で顕在化しており、1993年からは広島湾のカキにおいてもその発生がみられるようになり、*Alexandrium* 属藻類による麻痺性貝毒(Paralytic Shellfish Poisoning; PSP)は近年拡大傾向を示し、食品衛生上のみならず貝類の増養殖業の発展に大きな障害となっている。従来本属藻類の発生は、温帯海域に限られていたが、近年その発生が熱帯海域をはじめとして世界的規模となっている(Hallegraeff, 1993)。よって、本属藻類の生理・生態を踏まえた発生状況の把握及びその発生予察調査やその防除法の確立をめざすためにも、こうした微細藻類の正確で簡単な識別と生物学的特性の検討が急務となっている。

現在本属藻類は、光学顕微鏡を用いその微細な形態学的特徴を観察することによって分類・識別されている。しかし、このような形態学的特徴は非常に不安定であり、環境条件など外的条件によって変わりやすく、同一クローン内においても各細胞の形状やサイズに個体差があり(Taylor, 1984)、その増殖段階によってもその形態は変化しやすいので、形態学的特徴にのみもとづいた微細藻の識別には問題点があると言わざるを得ない。又最近では電子顕微鏡を用いた、細胞表面のより微細な構造や細胞内器官の構造が分類基準とされる場合も見られている(Montresor, 1990)。しかし、本手法を実際の現場レベルで応用することは困難と考えられ、さらにこのような形態学的特徴による分類には熟練した鑑識眼が要求され、現場レベルでの迅速な識別のためにもより信頼性の高い、簡便な識別・同定法の確立が強く望まれている。

*Alexandrium* 属は、渦鞭毛藻綱(Dinophyceae)、ペリディニウム目(Peridiniales)、

ゴニオラックス科(Gonyaulacaceae)の一属であり、細胞のサイズは約25-70 $\mu$ mで、その形状はほぼ球形である。しばしばいくつかの細胞が連なった連鎖群体がみられ、その細胞表面にはセルロースを主成分とする一定の配列をした大小さまざまな36枚の薄い鎧板を持ち、各一本の鞭毛の備わった縦溝と横溝を持つ。渦鞭毛藻は一般には二分裂により無性的に増殖するが、*Alexandrium*属に属するいくつかの種は、異なる2つの接合型を持つ細胞が接合を行い運動性接合子を経て、耐久性のある休眠接合子(シスト)を形成する有性生殖の生活環(Fig. 1)を示すことが確認されている(Anderson et al., 1980、吉松, 1984)。有性生殖を経て得られた休眠接合子は、冬期に海底で休眠した後水温が上昇する春先に発芽し増殖する。このため、休眠接合子は翌年の藻体発生のseed populationと考えられており、本藻の異常発生機構を解明する上で重要視されている(Anderson et al., 1978、1979)。

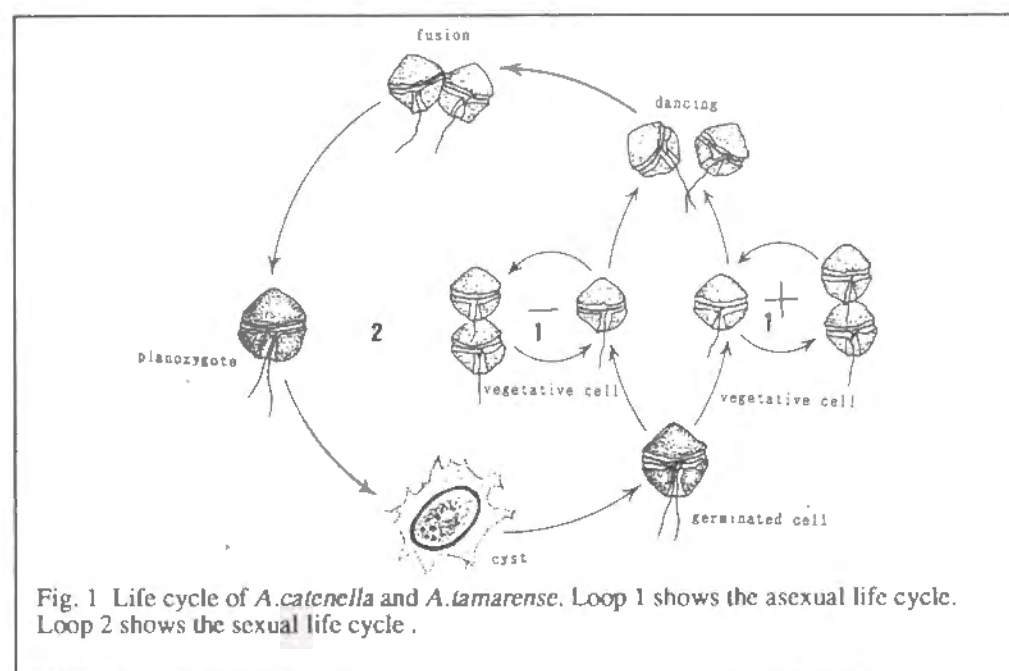


Fig. 1 Life cycle of *A. catenella* and *A. tamarense*. Loop 1 shows the asexual life cycle. Loop 2 shows the sexual life cycle.

*Alexandrium*属の属名については、1978年に開かれた有毒渦鞭毛藻の発生と増殖に関する第2回有毒海産植物プランクトン国際会議以後、研究者により使用する属名に差異がみられ、Taylor (1979)と福代 (1980)は*Protogonyaulax*を、Loeblichら(1979)は*Gessnerium*を、Balech (1985)とSteidinger (1983)らは*Alexandrium*を分類学的に正当な属名と主張し、大きな混乱が生じていた。これを受けて1989年に開かれた第4回有毒海産植物プランクトン国際会議において、Balechは*Protogonyaulax*属の形態学的特徴は*Alexandrium*属の特徴に包含され

ることを報告し(Balech, 1989)、以後本属名は *Alexandrium*属に統一することが決定された (Stainger and Moestrup, 1990)。現在本属は20種以上から構成されている(Balech, 1985、Yuki and Fukuyo, 1992)。そのうち我が国では、*A. affine*, *A. catenella*, *A. tamarense*, *A. fraterculus*, *A. peruviana*, *A. compressa*, *A. cohorticula*, *A. lee*, *A. insuetum*, *A. satoanum*と*A. pseudogonyaulax*の11種の発生が報告されている(Fukuyo, 1985、Yuki et al., 1990、Kita and Fukuyo, 1988)。

なかでも、*A. catenella*と*A. tamarense*は最もその分布域が広いだけでなく、麻痺性貝毒を生産してホタテガイやカキなどの貝類を毒化させるため、その発生が食品衛生上の出荷停止処置を導き、貝類増養殖漁業にとって死活問題となるため、各地の大学や水産試験場で生態調査や研究が行われている種である(福代, 1980)。そのうち、*A. catenella*(WHEDON et KOFOID)BALECHは、1936年に初めて種として記載され、その後北米カリフォルニア沿岸の毒化貝との関連が明らかとされて以来、アメリカ西海岸のみならず、チリ南部、南アフリカ(Taylor, 1984)、地中海 (Montresor et al., 1990) さらにオーストラリア(Hallegraeff et al., 1988) など世界各地でその発生が報告されている。我が国においては、北は岩手県大船渡湾から南は宮崎県北浦湾まで発生しているが主に南日本を中心として分布し(Fukuyo, 1985)、初夏に多く出現がみられる。日本沿岸海域では、毎年のようにその発生を繰り返しており、1982年には宮崎県北浦湾において本種による大規模な赤潮が発生し、貝類の毒化のみならずハマチやタイ数千匹の弊死を引き起こし、大きな漁業被害を出した(水産庁ら, 1982)。本種と形態学的に非常に酷似している*A. tamarense*(LEBOUR)BALECHは、1936年にその原記載がなされており、世界的には北米東西両海岸、南アフリカ、ヨーロッパ沿岸、ニュージーランド(Taylor, 1984)、地中海 (Montresor et al., 1990)さらにフィリピンやタイ(Fukuyo et al., 1988)と非常に広い分布域を持つ。日本では北は北海道噴火湾、南は高知県浅川湾までその発生が知られ、主に北日本を中心として広く分布する(Fukuyo, 1985)。最近では広島湾にも発生しカキが毒化した。本種は、赤潮を形成することは希であるが、貝類の毒化は*A. catenella*よりも顕著である。

本二種は、お互いその形態が類似しており細胞の外形からだけでは種の識別が困難である。そのため細胞の体長と体幅の比や連鎖群体形成能の有無(Taylor, 1984)に加えて、外殻鎧板の頂孔板の形と頂孔の位置、頂板1'と腹孔の有無あるいは後腹板の形と後部接続孔の有無などの形態学的特徴により識別が行われている(Fukuyo, 1985)。しかしながら、Taylorはこのような形態学的特徴は外的条件により変化を受けやすく、カナダにおいてはその形態学的特徴により当初*A. catenella*と判定された株が後に*A. tamarense*と判定された事例、あ

るいはカナダのブリテッシュ・コロンビアにおいて形態学的に両者の中間種の存在を報告して *A. tamarense*/*catenella* 複合群という種名を提唱しており (Taylor, 1984)、その形態学的分類はしばしば混乱している。又、本属藻類は個体変異が大きくしばしば外形や鎧板が変形して (Taylor, 1984)、種の識別を誤らせる原因となっている。このように本属の分類基準は未だ十分に確立したものとは言い難く、どの特徴をその分類形質に用いるかといった最も重要なことが、時代により、分類学者により異なっており、より簡便で迅速かつ正確な客観的識別法の確立が強く求められている。

一般的に種レベルで分類を行うに際し、多くの遺伝子の表現型の結果として発現される“形態”の比較の他に、有性生殖を有する種では相互交配が可能か否かといった生物学的種概念により種の識別が行われてきた。近年では、さらにその集団内にジーンプールを共有し個体間の遺伝子の交換再編成が可能であり、この結果正常な  $F_1$ ,  $F_2$  が得られるかどうか種識別の大きな判断基準となっている (Ichimura, 1985、市村, 1986)。ヘテロタリックな有性生殖を示す上記2種についても、日本産株について交配による接合能の有無により種の識別が試みられた結果 (Sako et al., 1990、金, 1991)、その接合頻度は低いものの種内株間においてその接合がみられ、得られた休眠性接合子 (シスト) より正常な  $F_1$  が得られた。その一方で、種間においては極めてその頻度は低いながらも接合及びシストの形成が認められ発芽も観察できたが、その発芽細胞は分裂することができずすべて死滅した。この結果により、本2種間で互いに接合することはできるが正常な  $F_1$  細胞を得ることはできず、本2種は遺伝的に近縁ではあるが生殖隔離が起こっており、別種である可能性が強く示唆されている。しかし、現段階では休眠接合子形成のための適切な条件がほとんど明らかとなっておらず、培養株におけるその接合率は非常に低いため、このような生物学的手法による種の識別は難しい状況である。

現在では、以上述べたような形態学的あるいは生物学的手法に加えて、対象生物のある遺伝子が発現された結果得られる相同な形質の差を、生化学的手法を用いて比較することにより、種の識別を行おうとする試みが盛んである。この比較生化学的手法としては、電気泳動法による粗タンパク質染色パターンの比較や酵素タンパク質におけるアミノ酸配列の変異により生ずる酵素多型の比較などが広く行われている。*Alexandrium* 属においては、1984年以降 Taylor と Cembella あるいは Sako らが *A. tamarense*/*catenella* 複合群について、Hayhome らが *A. tamarense*, *A. fundyense* と *A. affine* について酵素多型による解析を行っている (Taylor, 1984、Cembella and Taylor 1985、1986、Sako et al., 1990、Hayhome et al., 1989)。このうち、Sako らは、形態学的分類と対応した酵素多型分析法によ

り遺伝的差異を認め、グルーピングを行っているが、他の研究グループにおいては、形態学的に別種と判定されている株間において、明確な遺伝的差異が見いだせなかったことを報告している。一方、*Alexandrium* 属藻類が細胞中に持つゴニオトキシンやサキシトキシンといった神経毒の成分組成比較による化学的分類の試みも古くから多くなされている (Alam et al., 1979、Oshima et al., 1982、Cembella et al., 1987、Kim et al., 1993)。しかしながら、このような毒成分は個体群マーカーとして有用ではあるが、信頼できる分類形質であるか否かは未だに大きく議論の分かれるところであり、最終的には毒の生合成系遺伝子の解析を待たざるを得ず、毒組成比較による分類は問題点を抱えたままである。

近年、発現された情報を対象とするこのような形態分類や生化学的手法のみならず、環境変動に左右されない遺伝子そのものの情報を解析する分子生物学的手法が、バクテリアをはじめとして多くの生物の系統関係の解明に応用されている (Lane et al., 1985、Olsen et al., 1994)。本属藻類については、Destombe らが 1992 年にカナダ産 *A. tamarense* と *A. excavatum* の 18S rDNA の塩基配列を明らかにし本2種の比較について報告したのをはじめとして、1993年には Scholin and Anderson が 28S rDNA の塩基配列の比較による *Alexandrium* 属数種の集団解析について報告している。これらの報告により、本属藻類各種の系統的關係が明らかになりつつある。しかし、これらの領域よりデザインした DNA プローブを用いて、培養株の種の同定に応用するに際し、比較に用いられた領域が 28S rDNA の最も分岐的な部分であるにもかかわらず、その“分岐度”が十分ではないために、本属藻類を種レベルで同定することは難しい状況である (Anderson, 1993)。

そこで本研究では、まず前述の 18S や 28S rDNA よりも分岐度が高いと考えられている Internal Transcribed Spacer (ITS) と 5.8S rDNA 領域の塩基配列を本属数種について明らかにし、これを比較することによりその分子分類を行った後、これらの領域より種特異的 DNA プローブの作製を試み、培養株に対してその応用を試みた。さらに、実際の現場試料中に含まれる本属藻類を検出する際その応用が比較的容易と考えられる、本藻の細胞表層に特異的に反応するモノクローナル抗体の作製を試み、得られた各抗体の本属各株への反応性を解析することによりそのグルーピングを行った。これらの免疫学的手法と前述の分子生物学的手法による分子分類の結果を比較した後、これらの抗体の実際の現場海水試料中に含まれる藻体への反応性を解析した。

本論文では、第2章で *Alexandrium* 属藻類の rDNA 領域の塩基配列を用いた分子生物学的手法による分子分類とその応用について、第3章では本藻に反応性を示すモノクローナル抗体の作製と得られた各抗体と本属各株への反応性及

びこれらの抗体の現場試料への応用について論じた。

## 第 2 章 分子生物学的手法による有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium*属の分子分類

### 緒 言

有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium catenella* と *A. tamarense* は、現在その細胞表層の外殻  
錠板の微細な形態学的特徴により識別・分類されている。しかしこのような形  
態学的特徴による分類は、注目する形質が分類学者によって異なること、ある  
いは各形質の”重み”の付け方が主観的になりやすい等の問題点を持ってい  
る。また、このような形態学的特徴は環境条件等の外的条件によって変わりや  
すいため、形態学的特徴のみに基づいたこれらの微細藻類の分類には大きな問  
題がある。

近年、生物の種あるいは系統関係をより正確に理解し、できるだけ各形質の  
変異を客観的に取り扱うことを目的として、遺伝子そのものであるリボソーマ  
ルDNA(rDNA)やミトコンドリアDNA(mtDNA)などの分子を用い、さらにこれら  
の情報に統計処理を加えた系統学的研究が盛んに行われている(Olsen *et al.*, 199  
4)。このようなDNAの塩基配列に基づく生物の系統関係の推定は、種(株)間  
で異なる塩基座位の数を基に行われる。この違いは、種間においてその生殖隔  
離が起こった後にそれぞれに独立して蓄積した変異であるので、生殖隔離が早  
くから起こった種間ではその変異は大きく、生殖隔離が最近に起こった種間で  
はその変異が小さいと考えられる(木村, 1984、根井, 1990)。つまり  
相互に生殖可能な集団間では、生殖の過程を通じてその遺伝子間に組み換えが  
起こり、その遺伝子プールの”均一化”が起こった結果、生物種内でその変異  
は少ない一方、交配できない集団間(種間)においてはその変異がそれぞれに  
蓄積し、分岐的な配列を持つようになると考えられる。そこで筆者はこのよう  
なDNAを用いた分子生物学的手法を本属藻類に応用し、これらの藻類の系統関  
係を明らかにしようとした。

DNAの塩基配列の比較による系統関係の解析にはrDNAが最もよく用いられ  
ている(Ward *et al.* 1992, Olsen *et al.*, 1994)。真核生物のrDNAは、16S-like rDNA,  
5.8S rDNAおよび28S rDNAがタンデムに配置し、1つの転写ユニットを形成し  
これが核内に数百コピー以上存在すると言われている。これらの遺伝子間には  
転写される内部スペーサー(Internal Transcribed Spacer1&2, ITS1&2)が存在す  
る(Appels and Honeycutt, 1986) (Fig. 2)。rDNAの塩基配列は、その内部に非常に  
保存的な部分から分岐的な部分まで様々な領域を有するため、門レベルから集  
団レベルまでの非常に幅広くさまざまな系統関係の解析に用いられている。な



かでも、16S-like rDNAの塩基配列は、現在までに多くの生物の系統進化を論じるために応用されてきた(Peer *et al.*, 1993)。しかし、16S-like rDNAの塩基配列は、比較的その保存性が高く生物の”門”から”属”レベルでの比較に多用されているが、それ以下のレベルの系統関係を解析するにはその分岐度が十分でないと考えられている(White *et al.*, 1990)。Alexandrium属においては、Scholin *et al.*(1993)が*A. fundyense*の16S-like rDNAの塩基配列を決定しているが、その分岐度は本属藻類の集団マーカーとして十分でないことを明らかにしている。そこで彼らは、16S-like rDNAよりもより高い分岐度を有すると考えられている28S rDNAの塩基配列を用いて、本属各種の系統関係について解析した(Scholin and Anderson, 1993)。それにより、本属種間の系統関係はかなり明らかとなりつつあるが、これらの塩基配列よりデザインされたDNAプローブを用いて本属藻類培養株の同定を試みたところ、その反応特異性が低かったことを報告している(Anderson, 1993)。

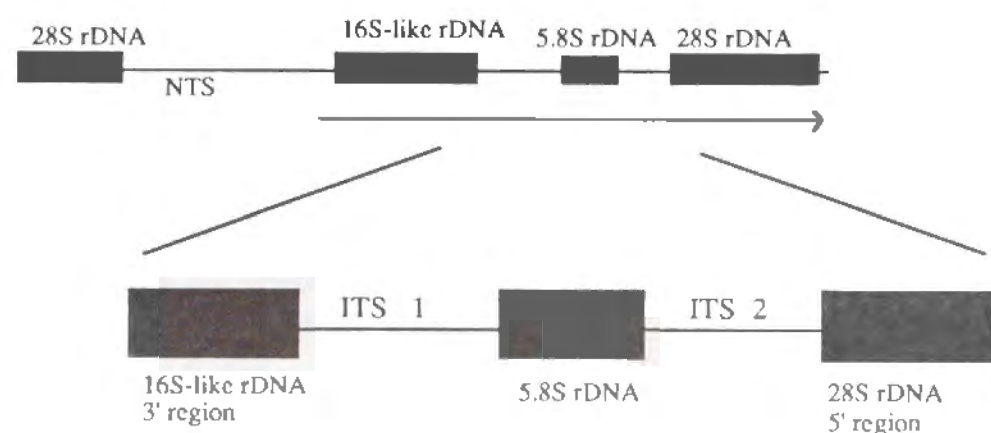


Fig. 2 真核生物におけるrDNAの構造模式図

最近、種や種間レベルでの系統関係の解析を行うに際して、転写される内部スペーサー(ITS)を用いた研究が続々と報告されている(Steane *et al.*, 1991、Bakker *et al.*, 1992、Kooistra *et al.*, 1992、O'Donnell, 1992、Coleman *et al.*, 1994)。そこで筆者は、28S rDNAよりもさらにその分岐度が大きいと推定されているITSの塩基配列に注目し、本属の種間・種内あるいは交配群の系統関係の解析とその分子分類を試みた。第1節では、本属各株の本領域の塩基配列を決定しこれを統計的に比較することにより、その系統樹を作成し、分子分類によって得られた結果と形態分類によって得られた結果との差異を検討した。第2節では、第1節において得られた塩基配列より”種”あるいは”集団”特異的マーカーを設定し、これらのマーカーからDNAプローブを作製することにより、こ

れらのプローブを本属藻類の同定に応用しうるか否かについて検討を行った。

## 第1節 ITSおよび5.8S rDNA領域のRFLP解析とその塩基配列の決定

### 材料 及び 方法

#### 1. 実験に用いた藻類とその培養

本実験に用いた各種藻類とその由来はTable 1に示した通りである。このうち、本章に用いた株は以下の株である。

- (1)TNシリーズ- 1987年和歌山県田辺湾の底泥中のシストより分離し、東京大学の福代康夫氏により形態学的に*A. catenella*と同定された無菌・クローン株4株。なお、各株の略号中Xは+株、Yは-株を示す。
- (2)OFシリーズ- 岩手県大船渡湾の1984年と1988年の底泥中のシストを発芽させ、これより分離し、無菌・クローンとした7株。そのうち、OFY071, OFX072, OFY101とOFX102株はFukuyo(1985)の形態学的分類に従い*A. catenella*と分類され、他3株OFX151, OFX181とOFX191株は*A. tamarense*と分類された。
- (3)瀬戸内海より分離された*A. catenella* MI7株。
- (4)香川県赤潮研究所吉松定昭氏により、高知県浦ノ内湾と鹿児島県山川湾よりそれぞれ分離され、分譲していただいた*A. catenella* ko-3株とY-2株。同様に吉松氏に分譲していただいた播磨灘産*A. tamarense* AT4株、播磨灘産*A. affine*株、小豆島産*A. insuetum*株、播磨灘産*A. pseudogonyaulax*株、播磨灘産*A. fraterculus*株、播磨灘産*Prorocentrum micans*株、高知県室戸岬産*Amphidinium carterae*株、播磨灘産*Heterocapsa triquetra*株。
- (5)OKシリーズ- 1987年岩手県越喜来湾より北里大学児玉正昭氏らにより分離され、分譲して頂いた*A. tamarense* OK875-1とOK875-6株。この2株は当研究室においてクローン・無菌化した。
- (6)Atシリーズ- 愛知県三河湾より愛知県水産試験場の石田氏により分離され、分譲していただいた*A. tamarense* At304AとAt503A-A2株。
- (7)1978年北海道噴火湾より東北大学の大島泰克氏により分離され、分譲して頂いた後、当研究室においてクローン・無菌化し、形態学的に*A. tamarense*と同定されたFK-788株。



Table 1. List of strains

Strains	Abbreviation	Mating type
<i>Alexandrium catenella</i> TN7(Tanabe Bay, Japan, 1987)	TNY7	-
<i>A. catenella</i> TN9(Tanabe Bay, Japan, 1987)	TNX9	+
<i>A. catenella</i> TN10(Tanabe Bay, Japan, 1987)	TNY10	-
<i>A. catenella</i> TN11(Tanabe Bay, Japan, 1987)	TNY11	-
<i>A. catenella</i> TN12(Tanabe Bay, Japan, 1987)	TNX12	+
<i>A. catenella</i> TN16(Tanabe Bay, Japan, 1987)	TNY16	-
<i>A. catenella</i> TN22(Tanabe Bay, Japan, 1987)	TNX22	+
<i>A. catenella</i> OFY071(Ofunato Bay, Japan, 1988)	OFY071	-
<i>A. catenella</i> OFX072(Ofunato Bay, Japan, 1988)	OFX072	+
<i>A. catenella</i> OFY101(Ofunato Bay, Japan, 1988)	OFY101	-
<i>A. catenella</i> OFX102(Ofunato Bay, Japan, 1988)	OFX102	+
<i>A. catenella</i> MI7(Harima Nada, Japan)	MI7	-
<i>A. catenella</i> ko-3(Uranouchi Bay, Japan, 1988)	ko-3	-
<i>A. catenella</i> Y-2(Yamakawa Bay, Japan, 1988)	Y-2	-
<i>A. catenella</i> W-7(Harima Nada, Japan)	W-7	-
<i>A. catenella</i> F+27(Harima Nada, Japan)	F+27	-
<i>A. catenella</i> F-77(Harima Nada, Japan)	F-77	-
<i>A. tamarense</i> OF031(Ofunato Bay, Japan, 1988)	OFY031	-
<i>A. tamarense</i> OF034(Ofunato Bay, Japan, 1988)	OFX034	+
<i>A. tamarense</i> OF041(Ofunato Bay, Japan, 1988)	OFY041	-
<i>A. tamarense</i> OF045(Ofunato Bay, Japan, 1988)	OFY045	-
<i>A. tamarense</i> OF051(Ofunato Bay, Japan, 1984)	OFX051	+
<i>A. tamarense</i> OF054(Ofunato Bay, Japan, 1984)	OFY054	-
<i>A. tamarense</i> OF151(Ofunato Bay, Japan, 1984)	OFX151	+
<i>A. tamarense</i> OF152(Ofunato Bay, Japan, 1984)	OFY152	-
<i>A. tamarense</i> OF161(Ofunato Bay, Japan, 1984)	OFY161	-
<i>A. tamarense</i> OF162(Ofunato Bay, Japan, 1984)	OFX162	+
<i>A. tamarense</i> OF181(Ofunato Bay, Japan, 1984)	OFX181	+
<i>A. tamarense</i> OF184(Ofunato Bay, Japan, 1984)	OFY184	-
<i>A. tamarense</i> OF191(Ofunato Bay, Japan, 1984)	OFX191	+
<i>A. tamarense</i> OF192(Ofunato Bay, Japan, 1984)	OFY192	-
<i>A. tamarense</i> OK875-1(Okirai Bay, Japan, 1987)	OK875-1	-
<i>A. tamarense</i> OK875-6(Okirai Bay, Japan, 1987)	OK875-6	-
<i>A. tamarense</i> At304A(Mikawa Bay, Japan, 1991)	At304A	-
<i>A. tamarense</i> At503A-A(Mikawa Bay, Japan, 1993)	At503A-A	-
<i>A. tamarense</i> FK-788(Funka Bay, Japan, 1978)	FK-788	-
<i>A. tamarense</i> HIAI(Hiroshima Bay, Japan, 1992)	HIAI	-
<i>A. tamarense</i> HI38(Hiroshima Bay, Japan, 1992)	HI38	-
<i>A. tamarense</i> AT4(Harima Nada, Japan, 1982)	AT4	-

Table 1. continued

Strains	Abbreviation
<i>Alexandrium tamarense</i> WKS-1(Kushimoto, Japan)	WKS-1
<i>A. tamarense</i> PE1V(Vigo, Spain)	PE1V
<i>A. tamarense</i> PW06(Araska, U. S. A.)	PW06
<i>A. tamarense</i> GTLI21(Moriches Bay, U. S. A., 1981)	GTLI21
<i>A. catenella</i> BGT1(Russian River, U. S. A., 1988)	BGT1
<i>A. fundyense</i> GTCA29(Gulf of Maine, U. S. A., 1985)	GTCA29
<i>A. tamarense</i> CU-1(Gulf of Thailand, Thailand)	CU-1
<i>A. tamarense</i> CU-13(Gulf of Thailand, Thailand)	CU-13
<i>A. tamarense</i> CU-15(Gulf of Thailand, Thailand)	CU-15
<i>A. cohorticula</i> CU-8(Gulf of Thailand, Thailand)	CU-8
<i>A. cohorticula</i> CU-11(Gulf of Thailand, Thailand)	CU-11
<i>A. cohorticula</i> MMBS8811-1(Sagami Bay, Japan, 1988)	MMBS8811-1
<i>A. affine</i> (Harima Nada, Japan, 1980)	
<i>A. lusitanicum</i> (Vigo, Spain)	
<i>A. insuetum</i> (Shoudoshima, Japan, 1985)	
<i>A. pseudogonyaulax</i> (Harima Nada, Japan, 1982)	
<i>A. fraterculus</i> (Harima Nada, Japan, 1990)	
<i>A. catenella</i> TT722-3 (F <sub>1</sub> strain obtained from TNY7 and TNX22)	TT722-3
<i>Prorocentrum micans</i> (Harima Nada, Japan, 1978)	
<i>Amphidinium carterae</i> (Muroto, Japan, 1987)	
<i>Heterocapsa triquetra</i> (Harima Nada, Japan, 1982)	
<i>Gymnodinium mikimotoi</i> G303-ax2 (Suo Nada, Japan, 1982)	G303-ax2
<i>Peridinium cunningtonii</i> PC6	PC6
<i>Cryptothecodinium cohnii</i> ATCC 30021	ATCC 30021
<i>Chattonella marina</i> NIES-118 (Harima Nada, Japan, 1982)	NIES-118
<i>Heterosigma akashiwo</i> NIES-5 (Gokasho Bay, Japan, 1966)	NIES-5

- (8)HIシリーズ- 広島県広島湾より南西海区水産研究所の山口峰生氏らによりクローン株として分離され、分譲していただいた*A. tamarense* HIAIとHI38株。
- (9)児玉氏らによりタイ国タイ湾より分離され、Fukuyoら(1988)の形態分類により*A. tamarense*と分類されているCU-1, CU-13とCU-15株。
- (10)和歌山県串本より大島氏により分離され、児玉氏らにより分譲して頂いた後、当研究室にてクローン・無菌化し、福代氏により*A. tamarense*と同定されたWKS-1株。
- (11)スペイン・ビゴ海洋研究所のB. Reguera氏らにより分離され、分譲を受けた*A. tamarense* PE1Vと*A. lusitanicum*株。これらの株は、当研究室においてクローン無菌化した。

(12)アメリカ・ウッズホール海洋研究所D. M. Anderson氏により分離され、分譲していただいたアメリカ・アラスカ産*A. tamarense* PW06株とメイン湾産*A. fundyense* GTCA29株。

Table 2. Composition of SWII medium

Ingredient	Concentration(/1L)
KNO <sub>3</sub>	72 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.5 mg
Na <sub>2</sub> -glycerophosphate	10.5 mg
Fe(as Fe-EDTA)	0.5 mg
Vitamin B <sub>12</sub>	0.6 μg
Biotin	1.0 μg
Thiamine	0.1 mg
Tris	1.0 g
Soil extract	30 ml
Sea water	970 ml

pH 7.8-8.0

全ての株の培養には、SWII培地(Table 2)を用い、北海道噴火湾産および岩手県大船渡湾産株については15℃にて、他の株については20℃にて標準培養条件下(14Light:10Dark, 100 mol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)で静置培養を行った。このうち、日本沿岸海域において代表的な有害種で、お互いに近似種と言われている*A. catenella*と*A. tamarense*のうち、岩手県大船渡湾産*A. tamarense* OFX151と和歌山県田辺湾産*A. catenella* TNY9株、これらに加えて無毒株と言われているタイ産*A. tamarense* CU-13の栄養細胞の光学顕微鏡写真をFig. 3に示す。

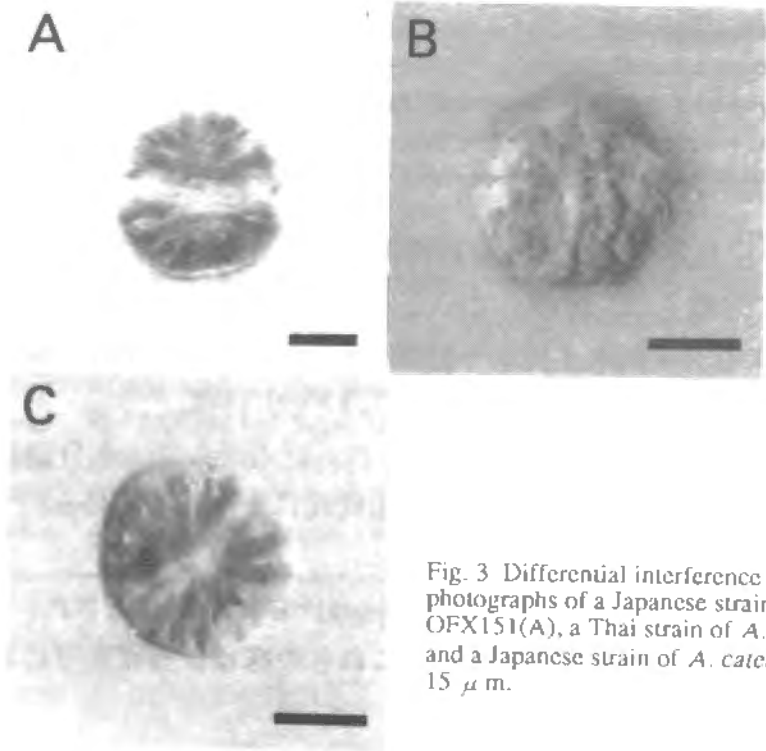


Fig. 3 Differential interference microscopical photographs of a Japanese strain of *A. tamarense* OFX151(A), a Thai strain of *A. tamarense* CU-13(B) and a Japanese strain of *A. catenella* TNY9(C). Bar= 15 μm.

## 2. DNAの抽出とその精製

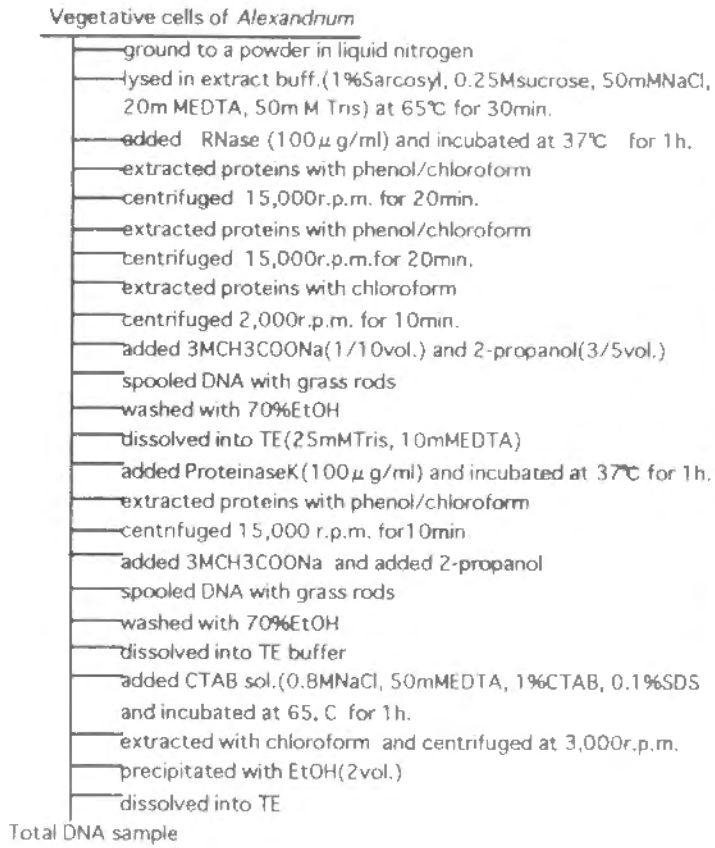


Fig. 4 Schematic diagram of the method of DNA preparation.

に、得られた粉末を50mLのCorning社製の遠心管にすばやく移し、これに10mLのDNA抽出buffer(1% Sarkosyl, 0.25M シュークロース, 50mM NaCl, 20mM EDTA (pH8.0), 50mM Tris-HCl (pH8.0) と10mM メルカプトエタノール)を加え、この懸濁液をよく攪拌したのち、これを65℃にて30分間保温した。さらに、その溶液に対して常法によりフェノール・クロロホルムにつづいてクロロホルム処理を行って、蛋白質を変性・除去した(Sambrook, 1989)。得られた水層について37℃にて1時間RNase A(100 μg/mL)処理を行った後に、0.6倍量の2-プロパノールにより核酸を沈殿させた。これをパスツールピペットにてまきとり風乾した後に、100 μg/mLのProteinase Kを含むTE buffer(50mM Tris (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0))5mLに溶解し、37℃にて1時間反応した。その後、この溶液に対してフェノール・クロロホルム処理を行った後に、その水層について2倍量のエタノールにより全DNAを沈殿させた。遠心分離(8,000g, 10分)により得られたDNAペレットを70%エタノールにより洗浄後、TE(10mM Tris(pH 8.0), 1mM EDTA(pH 8.0))1mLに溶解した。得られた全DNA溶液は

本属藻類の全DNAを抽出するのに用いた方法の概略をFig. 4に示した。対数増殖期後期の本属培養液20Lを15 μmのナイロンメッシュを用いて50mlまで濃縮した。これを卓上遠心機(Beckman社製)を用いて10分間遠心分離(500g)し、得られた藻体のペレットをすばやく乳鉢へ移し、これに液体窒素を加えて藻体を急速に凍結した。液体窒素を加えながら、乳棒を用いてこのペレットを粉末状となるまで細かく破碎した。十分に細胞を破碎した後

さらにその6倍量のCTAB溶液(0.8M NaCl, 50mM EDTA, 0.1% SDS, 1% セトリメチルアンモニウムブロミド, CTAB)を加えこれを65℃にて30分間反応させた。これに等量のクロロホルムを加え除蛋白処理を2回行った。得られた水層には、その2倍量のエタノールを加え-20℃にて一晩おいた後に、遠心分離(8,000g, 10分)により全DNA画分を回収し、これを適当量のTE bufferに溶解し以後の実験に用いた。

### 3. PCR法によるrDNA断片の増幅

本属藻類の5.8S rDNAと隣接するITS領域を含むDNA断片を得るために、本属藻類の全DNAを鋳型として用いて、PCR (polymelase chain reaction)法によりその増幅を行った。データベースより渦鞭毛藻3種を含む30種の生物の16S-like rDNA 3'末端及び28S rDNA 5'末端において保存性が高い部位を検索し、ここにそれぞれPCRプライマーを設定し、これらをファルマシア社製DNA合成機Gene assembler plusを用いて合成した。2種のプライマー(ITS AとITS Bプライマー)の塩基配列を以下に示す。ITS Aプライマー(5'-CCAAGCTTCTAGATCGTAACAAGG (ACT)TCCGTAGGT-3')、ITS Bプライマー(5'-CCTGCAGTCGACA(TG)ATGCTTAA (AG)TTCAGC(AG)GG-3') (これら2種のPCRプライマーは5'末端側に複数の制限酵素サイトを持つポリリンカーを連結している)。これら2種のPCRプライマーを用い、精製した本属藻類の全DNAを鋳型として、パーキンエルマー社製サーマルサイクラーPJ2000を用いてPCRを行った。その反応条件を以下に示す。反応系100 $\mu$ Lは、2.5 U Taq polymerase (Kurabo社製), 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 1X添付reaction buffer, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 10-100 ngの全DNAに100 pmolの2種のPCRプライマーからなる。PCRの反応条件は、94℃ 1分、55℃ 2分、72℃ 3分にて25サイクル本反応を行い最終サイクル終了後、さらに72℃にて7分反応させた。PCR増幅産物はクロロホルム処理を経てエタノール沈殿を行い、得られた沈殿をTE bufferに懸濁し、-20℃にて保存した。

### 4. PCR増幅産物の制限酵素断片長多型(RFLP)測定法

PCR増幅産物をFMC社製SeaPlaque GTGアガロースゲル(1.5%)を用いて、100 VにてTAE buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)を用いて、ファルマシア社製100 bpラダー・マーカーとともにその電気泳動を行い、得られた

DNA断片の大きさを確認した。さらに分光光度計を用いてその濃度を確認した後に、これらのDNA断片を4種の制限酵素Alu I, Rsa I, Mva IとNde I(Takara社製)を用いて消化した。これらをFMC社製NuSieve GTG アガロースゲル(6%)を用いて前述と同様に電気泳動を行い、泳動終了後常法により臭化エチジウムを用いてゲルを染色後、その写真撮影を行った(Sambrook, 1989)。

### 5. DNAクローニングとその塩基配列の決定法

PCR増幅産物のクローニングには、Novagen社製pT7Blue T-vector Kitを用いた。まず、PCR産物0.1 pmol (25ng)とpT7 blue vector 0.015 pmol(25ng)をTakara社製Ligation kitを用いて16℃にて1時間ライゲーションさせ、これをコンピテント化された大腸菌NovaBlue Competent細胞にトランスフォーメーションさせた。これをアンピシリンを含むLB寒天プレートに塗抹し、トランスフォーマントを選択した後、これをLB液体培地に接種し1晩培養後、遠心分離(5,000g, 10分)によりその菌体を得た。これよりアルカリSDS法を用いてそのプラスミドを回収し、これをTE bufferに溶解した(Sambrook, 1989)。さらに0.6倍量のポリエチレングリコール溶液 (20%ポリエチレングリコール(M.W. 6,000), 2.5 M NaCl)を加えて、0℃にて1時間インキュベートし、その後遠心分離(8,000g, 10分)によりそのDNAを回収し、これを70%エタノールを用いて洗浄した後、得られたDNAをTE bufferに溶解した。得られたプラスミドの塩基配列を決定するに際し、ABI社製ダイデオキシ・サイクルシーケンシング・キットを用いた。前述の2種のPCRプライマーに加えて、内部シーケンスプライマーとしてH3, H5そしてM2プライマーを用いた。以下にその塩基配列を示す。

H3プライマー(5'-TGAAGAATGCAGCAA(AC)ATGC-3'),

H5プライマー(5'-CGATGATTAGGTTTTGCAAC-3'),

M2プライマー(5'-GG(CT)ACAAGTAACATTCAAAC-3')

本キットのシーケンス反応手順説明書に従って、これらのプライマーを用いてサイクルシーケンシングPCR反応を行った後、これらをCTAB溶液(5% CTAB, 0.5M NaCl)を用いて精製した。これを、ABI社製シーケンサー373Aを用いて電気泳動を行ない、その塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、上流プライマーと下流プライマーを用いて1座位について少なくとも5回その配列を決定し、真の配列を求めた。

### 6. 塩基配列の統計的処理



得られた各塩基配列を、日立ソフトウェア・エンジニアリング社の遺伝子解析ソフトDNASISを用いて連結したのち、得られたITS領域全長の塩基配列を、データベース中の他生物の本領域の塩基配列と比較することにより、その16S like rDNAとITS1, ITS 1 と5.8S rDNA, 5.8S rDNAとITS2そしてITS2と28S rDNAの境界部位を決定した。得られた各株の塩基配列について、京大理学部分子進化学教室の大型計算機を用いて、マルチプルアライメントを行った。さらに、Jukes-Cantor法(Jukes and Cantor, 1969)により、その遺伝子距離を算出した。それらを用いて近隣結合法(NJ法)(Saitou and Nei, 1987)によりその系統樹を作成した。得られた系統樹の信頼性については、ブーツストラップを1000回行うことにより判定し、その再現率を系統樹の各分岐点に記した。

## 結 果

### 1. 本属藻類のRFLP解析

*Alexandrium*属の全DNAを抽出するに際し、当初はLiuら(1990)の方法によりその抽出を行っていたが、得られた全DNAをPCRの鋳型として用いた場合、しばしばその増幅産物が得られなかった。そこでDNAを精製するために種々の方法を試みた結果、CTAB溶液を用いてそのDNAの精製を行うと、安定してそのPCR産物が得られることが判明した。

CTAB溶液を用いて精製した本属藻類7種30株より得られた全DNAを鋳型として、ITS AプライマーとITS Bプライマーを用いてPCR法によりITSと5.8S rDNA領域の増幅を試みた結果、すべての株についてその増幅産物が得られ、その長さは約610bpであることが明らかとなった。このうち、日本産23株についてのPCR産物についてその電気泳動の結果をFig. 5Aに示す。

これらの増幅産物を、各種の制限酵素を用いて消化し、その電気泳動を行った結果、RFLPから各種の特徴を下記のように整理することができた。

a) 制限酵素Alu Iを用いて消化を行った場合(Fig. 5B)、和歌山県田辺湾、岩手県大船渡湾、播磨灘、高知県浦ノ内湾そして鹿児島県山川湾産*A. catenella* 9株は、同一の制限酵素切断パターンを示す一方で、他4種*A. tamarense*, *A. affine*, *A. insuetum*と*A. pseudogonyaulax*の切断パターンと比較すると明確に識別

可能で、*A. catenella*株とこれらの種間においてRFLPの存在が確認できた。また、日本沿岸5地点、岩手県大船渡湾、越喜来湾、北海道噴火湾、広島県広島湾そして播磨灘産*A. tamarense* 10株はそれぞれ同様のパターンを示す一方で、和歌山県串本産*A. tamarense* WKS-1株はこれらとは異なるパターンを示した。*A. affine*, *A. insuetum*および*A. pseudogonyaulax*のそれは互いに異なり、さらに前述の3パターンとは明確に区別できた。

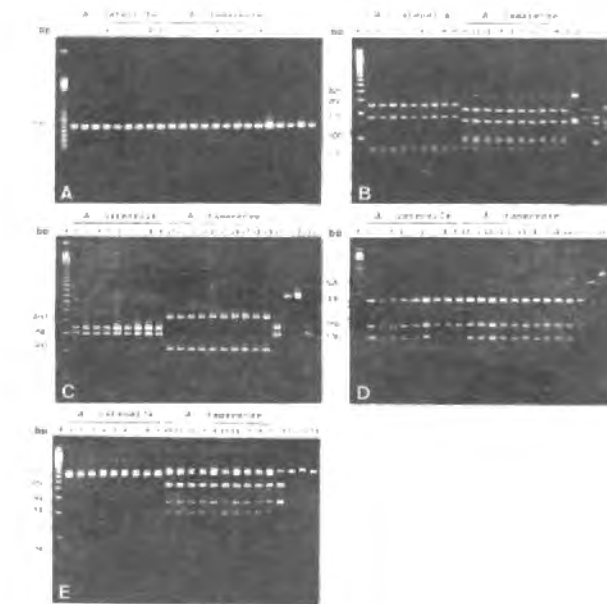


Fig. 5 Amplified products of internal transcribed spacer and 5.8S rDNA region from five species of *Alexandrium* (A) and digestion of the PCR products using AluI (B), RsaI (C), MvaI (D), and NdeI (E). Lane p, 100 base pair ladder markers; Lane 1, *A. catenella* TNY11; Lane 2, *A. catenella* TNX12; Lane 3, *A. catenella* TNX22; Lane 4, *A. catenella* OFX072; Lane 5, *A. catenella* OFY101; Lane 6, *A. catenella* OFX102; Lane 7, *A. catenella* M7; Lane 8, *A. catenella* ko-3; Lane 9, *A. catenella* Y-2; Lane 10, *A. tamarense* OFX151; Lane 11, *A. tamarense* OFX181; Lane 12, *A. tamarense* OFX191; Lane 13, *A. tamarense* FK-78; Lane 14, *A. tamarense* OK875-1; Lane 15, *A. tamarense* OK875-6; Lane 16, *A. tamarense* HIAI; Lane 17, *A. tamarense* HI38; Lane 18, *A. tamarense* AT4; Lane 19, *A. tamarense* AT63I; Lane 20, *A. tamarense* WKS-1; Lane 21, *A. affine*; Lane 22, *A. insuetum*; Lane 23, *A. pseudogonyaulax*.

b) 制限酵素Rsa Iを用いてその消化を行った場合(Fig. 5C)、4つのI T Sタイプが確認できた。すべての*A. catenella*株と*A. tamarense*WKS-1株は同一パターンを示す一方、*A. tamarense* (WKS-1株を除く)、*A. pseudogonyaulax*, *A. affine*そして*A. insuetum*のそれとはそれぞれ区別することができた。また、*A. affine*および*A. insuetum*はRsa Iサイトを持たなかった。

c) 制限酵素Mva Iを用いてこれらの断片を消化した結果(Fig. 5D)、5つのI T Sタイプが確認できた。WKS-1株を除くすべての*A. tamarense*株は同一のパターンを示した。一方、WKS-1株と*A. catenella*株は同一のパターンを示し、さらに前述の*A. tamarense*のパターンとはその区別が可能であった。また*A. affine*株の2本のバンドは、*A. tamarense*株の4本のバンドのうちの2本とその移動度がほぼ一致した。*A. insuetum*や*A. pseudogonyaulax*株のそれは互いに異なり、前述の3つのパターンとも異なっていた。

d) Nde Iを用いてこれを消化した結果(Fig. 5E)、*A. affine*, *A. insuetum*そして*A. pseudogonyaulax*株はそのサイトを持たなかった。WKS-1株を除く*A. tamarense*株は同様のパターンを示し、またWKS-1株の3本のバンドは*A. tamarense*の5本のバンドのうちの3本の移動度とほぼ一致していた。

以上の結果は、本実験で用いた本属藻類をITSタイプとして6つに分子分類することが可能であることを示している。

(1) *A. catenella*タイプ; (2) *A. tamarense*タイプ; (3) WKS-1タイプ; (4) *A. affine*タイプ; (5) *A. insuetum*タイプ; (6) *A. pseudogonyaulax*タイプ。

Fig. 5中には示せなかったが、アメリカ・アラスカ産*A. tamarense*PW06株とメイン湾産*A. fundyense*は*A. tamarense*タイプの、またヨーロッパ・スペイン産*A. tamarense*PE1V株は、WKS-1タイプの遺伝子型を持つことも明らかとなった。

また、各種制限酵素による消化実験の結果、Fig. 5 BおよびEのlane 10-19でも明らかなように、*A. tamarense*タイプの株はその切断断片の長さの総計が610 bpの2倍の約1200 bpとなることが明らかとなり、その増幅産物中に少なくとも2種の異なる配列を持つDNA断片を含んでいる可能性が示唆された。

## 2. 各株のITSおよび5.8S rDNA領域の塩基配列の比較

前述したように本藻各株のITS領域をPCR法により増幅し、得られたDNA断片についてRFLP解析を行った結果、本属藻類の分子分類を行うに際し、ITS領域がその”分子マーカー”となり得る可能性が示されたので、さらに本領域について詳細な情報を得るために、各株の塩基配列を決定しこれらの比較を試みた。まず、*Alexandrium* 6種25株のPCR増幅産物をすべてクローニングした後に、各株についてランダムに6-7クローンを選択しその部分塩基配列の決定を行った結果、日本産とアメリカ産*A. tamarense*株9株とアメリカ産*A. fundyense* (*A. tamarense*タイプ) 株は、その増幅産物中に異なる2種のDNA断片をほぼ1:1の割合で持っていることが明らかとなった。一方、他の株のPCR増幅産物中にはこのような遺伝子間での変異は見られなかった。*A. tamarense*の有する2種のDNA断片の5.8S rDNA部分について、DNASISを用いてデータベース中の渦鞭毛藻をはじめとした他生物の本領域とその相同性の比較を行ったところ、一方のDNA断片はすべての既知の5.8S rDNAに対して高い相同性を示し、これを1型遺伝子と名付け、相同性の低い他方の遺伝子を2型と名付けた。*A. tamarense*株については、1型の遺伝子の塩基配列の決定に際しインナープライマーとしてM2とH3プライマーを、2型の場合にはM2とH5プライマーを用い、各株についてこれら2種のDNA断片の全塩基配列を決定した。一方、他タイプの株についてはすべてM2とH3プライマーを用いてその全塩基配列を決定した。得られた各株の全塩基配列について、マルチプルアライメントを行った結果を、Fig. 6に示す。この結果より、ITSと5.8S rDNAを含んだ領域(約520 bp)を用いてJukes-Cantorの式により各株の遺伝子距離を求めた。Table 3には代表的な株間の遺伝子距離を示した。株名の次の-1, -2は、それぞれ1型、2型の遺伝子を示す。これらを用いて近隣結合法によりその系統樹を作成した(Fig. 7)。

Table 3. Distance values between ITS and 5.8S rDNA sequences of 11 strains of *Alexandrium*

	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.
1. <i>A. tamarense</i> OFX191-1	0.004	0.006	0.039	0.217	0.217	0.220	0.198	0.391	0.323	0.329
2. <i>A. tamarense</i> PW06		0.010	0.043	0.217	0.217	0.210	0.198	0.398	0.323	0.329
3. <i>A. fundyense</i> GtCA29-1			0.045	0.220	0.220	0.222	0.201	0.398	0.329	0.336
4. <i>A. tamarense</i> OFX191-2				0.236	0.247	0.250	0.228	0.418	0.348	0.351
5. <i>A. catenella</i> TNY11					0.006	0.008	0.180	0.398	0.342	0.342
6. <i>A. catenella</i> OFX102						0.032	0.178	0.401	0.345	0.345
7. <i>A. catenella</i> Y-2							0.180	0.405	0.345	0.345
8. <i>A. tamarense</i> WKS-1								0.361	0.299	0.299
9. <i>A. tamarense</i> CU-15									0.320	0.323
10. <i>A. affine</i>										0.010
11. <i>A. tamarense</i> CU-1										







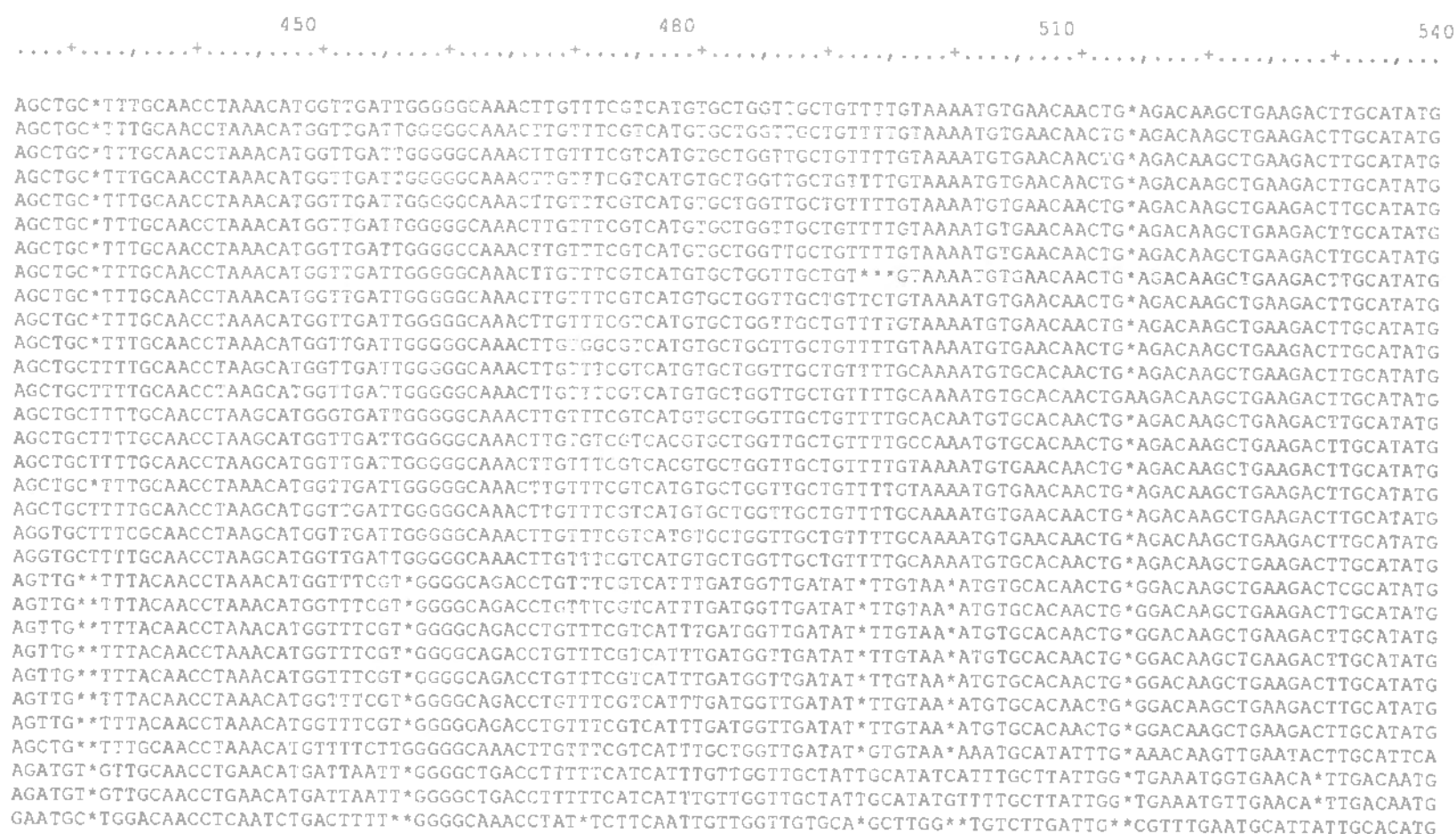


Fig. 6 c Continued.

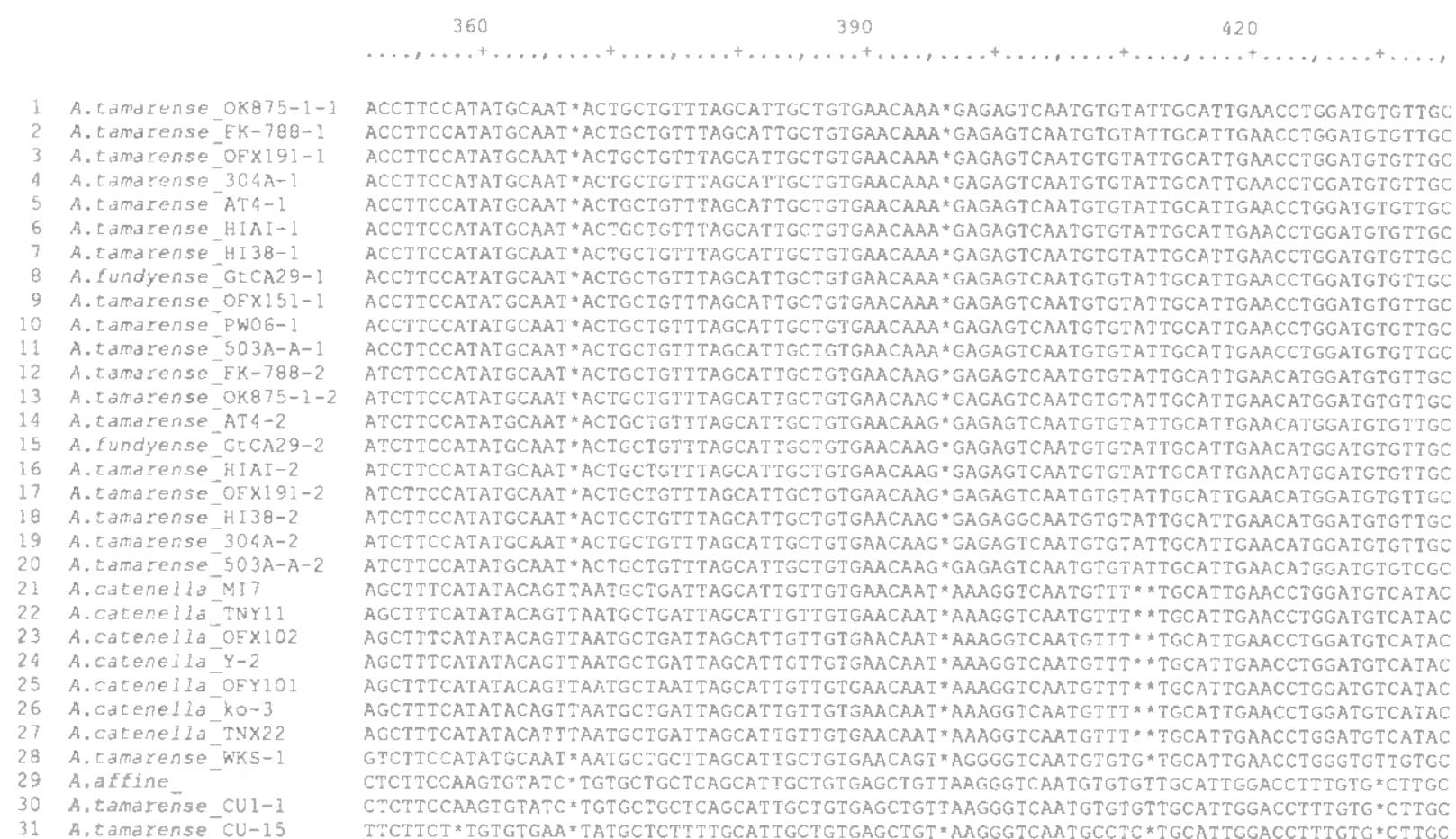


Fig. 6 c Sequence alignment of the internal transcribed spacer 2 (ITS 2).

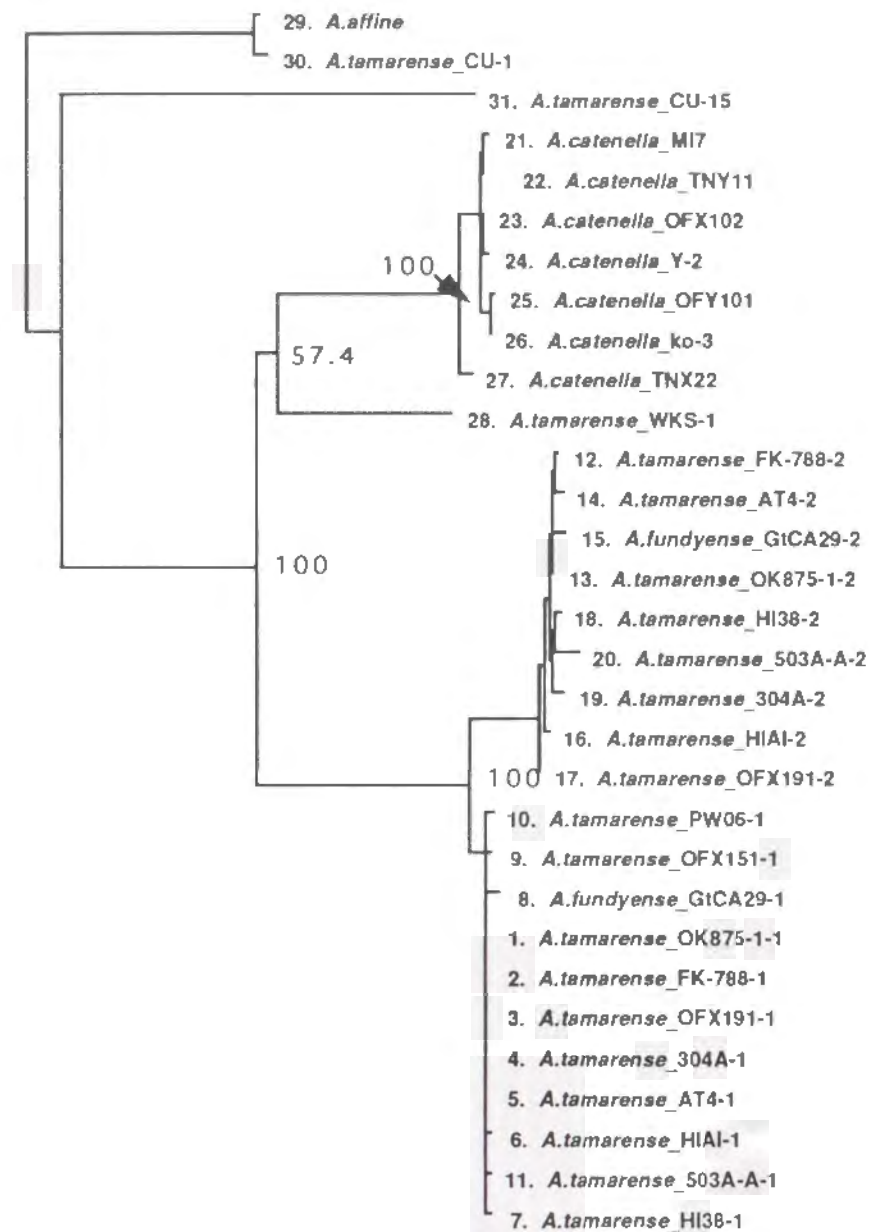


Fig. 7 Molecular phylogenetic tree inferred from internal transcribed spacers and 5.8S rDNA in *Alexandrium* species by means of a neighbor joining method.

その結果、アメリカ・アラスカ産 *A. tamarense* とメイン湾産 *A. fundyense* 株をはじめとして、日本各地北海道噴火湾、岩手県大船渡湾、同 越喜来湾、愛知県三河湾、播磨灘そして広島湾より分離された *A. tamarense* 株は 1 つのブランチ (*A. tamarense* タイプ) を形成し、その中で 1 型と 2 型の遺伝子はそれぞれ別のクラ

スターを形成し、これら両タイプの遺伝子距離は約 0.04 と極めて小さかった。また、日本各地 5 地点大船渡湾、和歌山県田辺湾、播磨灘、高知県浦ノ内湾そして鹿児島県山川湾産 *A. catenella* 7 株は、*A. tamarense* タイプの株とは異なる別のブランチ (*A. catenella* タイプ) を形成し、両 2 タイプ間の遺伝子距離は約 0.22 で、この結果により両種を明確に区別することが可能であることが明らかとなった。一方、*A. tamarense* WKS-1 株は前述の 2 タイプの株とは異なるブランチを形成し、*A. tamarense* タイプあるいは *A. catenella* タイプの株との遺伝子距離はそれぞれ約 0.20 と 0.18 であった。さらにタイ産 *A. tamarense* CU-15 株は、前述のいずれのタイプの株とも異なるブランチを形成し、本株と *A. tamarense*, *A. catenella*, WKS-1 タイプとの遺伝子距離はそれぞれ約 0.40, 0.40 と 0.36 とかなり大きな値を示した。また、タイ産 *A. tamarense* CU-1 株は、日本産 *A. affine* 株と同一ブランチを形成することも明らかとなった。本領域を用いて *A. insuetum* や *A. pseudogonyaulax* 株と前述の *A. catenella*・*A. tamarense* タイプ間の遺伝子距離を計算した結果、その距離がかなり大きく、これを用いて系統樹を作製すると、そ

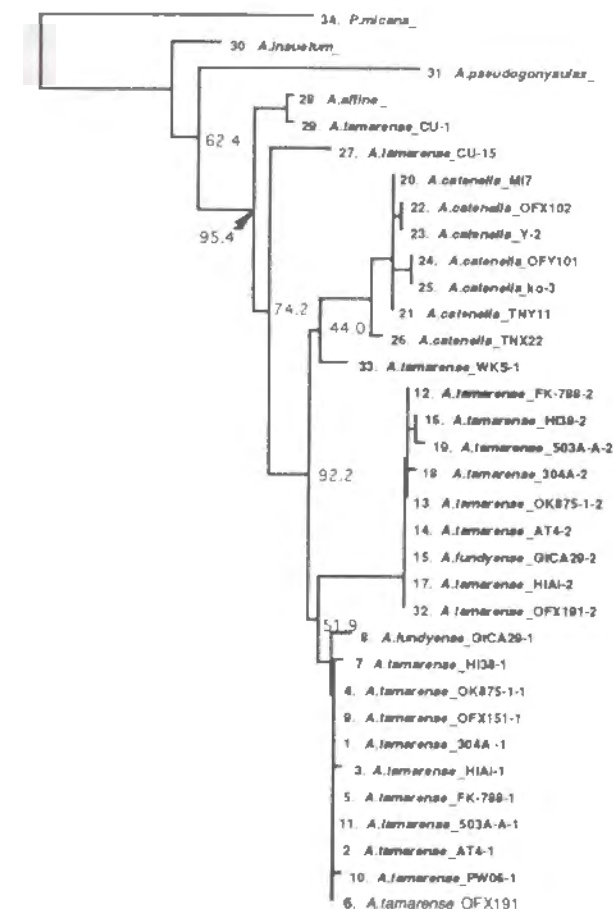


Fig. 8 Molecular phylogenetic tree inferred from 5.8S rDNA in *Alexandrium* species by means of a neighbor joining method

の信頼性が低下する可能性があったため、保存性が高いと考えられる 5.8S rDNA 領域のみ(約 160 bp)についてそれらの株間の遺伝子距離を求め、近隣結合法によりその系統樹を作成した結果(Fig. 8)、*A. tamarense*, *A. catenella*, *A. affine* 株と *A. insuetum* 及び *A. pseudogonyaulax* 株の系統的な相互関係を明らかにすることができた。



PCRの鋳型として*Alexandrium*属のDNAを用いるためには、DNAをCTABを用いて精製する必要があった。CTABは電荷を帯びた界面活性剤であり、多糖のようなポリアニオンと非溶存性の複合体を形成することが知られている。本藻においては、CTABがそのDNA両分中の多糖を除去したか、あるいはDNAに強固に結合していた蛋白質を除去した可能性がある。Rowan and Powers(1991)も共生渦鞭毛藻*Symbiodinium*属の全DNA抽出に際し、CTABが有効であることを報告しており、渦鞭毛藻のDNAの精製に際しCTABが有効である可能性が示唆された。

5.8S rDNAを含むITS領域の長さは、他生物では種間のみならず種内のレベルでもヴァリエーションが存在することが報告されている。Steaneら(1991)は、オーストラリア産の紅藻*Mychodea*属数種のITS領域をPCR法を用いて増幅し、その産物の大きさを電気泳動により比較している。その結果、本属種間でその長さの多型が見られたことにより、このITSの長さがこれらの種のマーカーになりうるのではないかと指摘している。また、Bakkerら(1992)は緑藻*Cladophora albida*の世界各地産株について本領域を用いることによりその集団解析を行った結果、種内においても本領域の長さの多型が存在することを報告した。一方、*Alexandrium*属6種30株はすべてその長さが約610bpであり、種間・種内レベルにおいて長さの多型は見られなかった。このように、*Alexandrium*属各種間において本領域の長さが保存的であったことから、本属6種は進化的に近縁である可能性が示唆された。また全長610bpのうち、16S-like rDNAの3'末端と28S rDNAの5'末端部位を除いた5.8S rDNAとITS領域の長さは約520bpであった(Table 4)。これは、今までに報告されている*Alexandrium*属以外の他生物の本領域の長さ(Bakker et al., 1992)と比較して、最も短いものの1つであった。

Table 4. Length polymorphism among 5 species of *Alexandrium* in ITS and 5.8S rDNA regions

	ITS 1 (bp)	5.8S rDNA (bp)	ITS 2 (bp)	Total length (bp)
<i>A. catenella</i>	166	160	192	518
<i>A. tamarense</i>	165	160	197	522
<i>A. affine</i>	173	159	203	535
<i>A. pseudogonyaulax</i>	184	161	173	518
<i>A. insuetum</i>	189	159	184	532
<i>P. micans</i>	211	160	199	565

ITS領域のRFLP解析および塩基配列の決定の結果、”*A. tamarense*タイプ”の株より得られたPCR産物中には2種のDNA断片が存在することが明らかとなった。このうち1型の遺伝子は、データベース中の他生物の5.8S rDNAに相同性が高い。一方、2型のそれは相同性がそれほど高くなかった。これに関連して、Scholin et al.(1993)は北米産の*A. fundyense*株の16S-like rDNAについての解析を行っており、その結果2種の遺伝子を同定しこれらをデータベース中の他生物の遺伝子と比較した結果、一方の遺伝子は他生物のそれと相同性が高くこれをA型とし、それほど相同性が高くない他方の遺伝子をB型と名付けた。彼らは、これら2種の遺伝子の比率は約1:1であることを明らかにし、さらに両遺伝子の塩基置換のパターンを詳細に解析した結果、A型遺伝子においては真核生物のみならず全生物において保存的な部位での塩基置換は見られなかった一方で、B型遺伝子ではこのような部位においてしばしば置換が見られたことを報告している。さらに彼らは、その転写産物についても解析を行い、A型のrRNAの転写を確認したが、B型のそれを確認できなかったことにより、B型は偽遺伝子(pseudogene)ではないかと考察している。一方、本研究において解析したITS領域にも2種の遺伝子が存在しており、これらは彼らのA型とB型遺伝子に1対1に対応している可能性が高いと思われる。1型と2型の遺伝子間での塩基置換を検討した結果、ITS1領域の約180塩基中4塩基で、ITS2領域の約200塩基中5塩基で置換が起こっているのに対して、5.8S rDNA160塩基中11塩基で置換が起こっていることが明らかとなり、5.8S rDNA領域内での1サイトあたりの両遺伝子間での塩基置換率は、ITS領域におけるその約2倍であることが明らかとなった。さらに、他生物の5.8S rDNA領域との相同性の比較の結果とあわせて1型遺伝子がA型で、2型遺伝子がB型遺伝子に対応する可能性が高いと思われる。しかし、その転写産物の同定を試みたにもかかわらずその結果が得られなかったため、どちらの遺伝子が転写されているのか、また2型の遺伝子が偽遺伝子であるのかどうかについては明らかにすることができなかった。*A. tamarense*タイプ以外の株については、系統的に比較的近縁と考えられる*A. tamarense* WKS-1や*A. catenella*株をはじめとしてすべて”均一”な遺伝子を持っていることが示唆された。この結果は、*A. tamarense*タイプの株が*A. catenella*やWKS-1タイプと分岐した後に、変異を持つ遺伝子を持つようになり、これがゲノム内に急速に広がったと考えられる。一般に、同種内のこのようなスペーサー領域は協調進化と呼ばれるメカニズム(Smith, 1974)により”一様化”されると言われている。今回得られた1型と2型遺伝子の存在は、一見このような概念と矛盾するように見える。しかし、最近Hillisら(1991)は実験的なデータを示しながら、協調進化のメカニズム

において”偏向した不等交差”や”偏向した遺伝子交換”の果たす役割について明らかにしており、本藻 *A. tamarense* タイプにおいてもこのようなメカニズムにより1型と2型遺伝子がゲノム内に固定した可能性も考えられる。

ITSおよび5.8S rDNA領域を用いRFLP解析法あるいはDNA塩基配列の比較により、日本産 *A. catenella* 株と *A. tamarense* 株を系統的かつ明確に区別することができた。この結果は、Sakoら(1990)による本2種間での交配実験やアインザイムを用いたその集団解析の結果に一致し、さらに第3章で述べるモノクローナル抗体を用いた免疫学的手法によるグルーピングの結果に一致した(Sako et al., 1993)。またScholin and Anderson (1993)も、日本産両2種の28S rDNAの塩基配列の比較を行った結果、その識別が可能であることを明らかにしている。以上の分子生物学的手法、免疫学的手法、生物学的手法は、両種を別種としたFukuyo(1985)の形態学的手法を裏付けた。一方、*A. fundyense* は、現在Balech(1985)の形態分類により *A. tamarense* とは別種と分類されているが、本研究ではアメリカ・アラスカ産 *A. tamarense* とメイン湾産 *A. fundyense* 株は、日本産 *A. tamarense* と同一のITSタイプを示した。Scholin and Anderson(1993)も、28S rDNAを用いてその分子識別を行い、本株は *A. tamarense* タイプと同一の遺伝子型を持つことを明らかにしている。また、筆者らが作製したモノクローナル抗体(第3章)によっても同様の結果を得ている(Adachi et al., 1993a)。さらにHayhomeら(1989)は、アインザイム分析により北米産の *A. tamarense* と *A. fundyense* 両2種を識別することができなかったことを報告している。以上の結果により、Balechの唱える *A. fundyense* を *A. tamarense* と別種とすることには大きな疑問がある。

日本産 *A. tamarense* WKS-1株は、*A. tamarense* タイプとは異なるITSタイプを示した。本株は、*A. catenella* や *A. tamarense* タイプの株とはその遺伝子型において明確に区別することができるが、同時に *A. catenella* や *A. tamarense* タイプの株と進化的に近縁であることも明らかとなった。これに関連して、筆者らは本株より全蛋白質を抽出し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)分析を行って総蛋白質のパターンを他の *A. tamarense* 株と比較したところ、これらを明確に区別することが可能であることを明らかにした(Adachi et al., 1993b)。さらに、他の *A. tamarense* 株は有毒であるのに対して、本株は無毒株であるという点で異なっている。以上の結果により、WKS-1株は他の *A. tamarense* 株とは近縁であるが明確に異なる遺伝的な因子を有していることが明らかとなった。しかし現時点で、本株が他の *A. tamarense* と別種であるかどうかを断定するには、本株と他の *A. tamarense* 株との交配実験を行うなど、更なるデータが蓄積される必要があると考えられる。なお、モノクローナル抗体に

よっても同じ結果となっている(第3章)。

Fukuyo(1988)の形態分類により同定されたタイ産 *A. tamarense* CU-15株は、得られた系統樹の中で日本産 *A. tamarense* とは異なるブランチを形成した。本株と、*A. catenella* および *A. tamarense* の各株との遺伝子距離はともに0.4であり、この値は日本産 *A. tamarense* と *A. catenella* 両種間の遺伝子距離(0.22)よりもかなり大きな値である。この結果により本株は、日本産 *A. catenella* あるいは *A. tamarense* のいずれとも遺伝的にかなり異なるゲノタイプを持つことが明らかとなった。本株より得られたモノクローナル抗体の結果(第3章)や本株の全蛋白質のSDS-PAGEによるバンドパターンが日本産 *A. tamarense* 株のそれとは全く異なるという事実(Adachi et al., 1993b)は、前述の分子生物学的手法による結果を裏付けるものと考えられる。さらにITSを用いた系統樹中の本株の系統学的位置は、Scholin and Anderson(1993)が28S rDNAの塩基配列を用いて作製した系統樹中の位置とはほぼ同じであり、以上の結果をふまえるとCU-15株は日本産 *A. tamarense* や *A. catenella* とは別種である可能性が高いと思われる。一方、タイ産 *A. tamarense* CU-1株については日本産 *A. affine* と同じブランチを形成した。CU-1株は、北里大学から分譲して頂き、当初東京大学の福代氏により *A. tamarense* と同定されていた。しかし、Scholin and Anderson(1993)の28S rDNAの塩基配列の比較や本研究のITSおよび5.8S rDNA領域の解析の結果により、本株は *A. affine* ではないかという指摘を受けて、福代氏が本株の再同定を行ったところ、CU-1株は *A. affine* であるとされた。いずれにしても、北里大学から分譲していただいた本株は *A. affine* 株との遺伝子距離が極めて小さく、他種の株とのそれは大きいことから *A. affine* 種であると思われる。このように *A. affine* についても、ITS領域を用いてその分子識別が可能であり、*A. tamarense* と *A. catenella* の各株を含むクラスターからその分岐が見られた。Scholin and Anderson(1993)も、28S rDNAの塩基配列を用いて本種の系統学的位置について明らかにしており、これは今回得られた結果に一致した。

*A. insuetum* と *A. pseudogonyaulax* の株についてもそれぞれのITSタイプを同定することができた。近年、Balech(1993)は *Alexandrium* 属を *Alexandrium* 亜属と *Gessnerium* 亜属に分けるべきであると提唱している。また彼は、上記2種は *Gessnerium* 亜属に属するとしている。これら2種は、形態的に非常に酷似しており、その微細な特徴により分類されており(Yuki and Fukuyo, 1992)、その識別は困難であるとされている。今回、本2種をITS領域を用いて明確に識別すると同時に、これら2種と *A. affine*, *A. tamarense* や *A. catenella* との系統的な関係を初めて明らかにできた。

今回ITS領域を用いて本属藻類の系統関係を明らかにするために、近隣結合

法(Saitou and Nei, 1987)を用いた。近隣結合法は、遺伝子距離行列データより、最もその距離が小さいものを近隣とし、最小進化の原理に基づくアルゴリズムにより段階的に近隣を見だし、最終的には1個の無根系統樹を得る方法である。この方法を用いると、扱う生物が100を越えても短時間でその系統樹を得ることができ、しかも進化速度一定を仮定していないため系統によって進化速度に違いがあっても、比較的正しく真の樹形を復元することができ、最近最も多用されている方法である。本ITS領域を用いて系統樹を作成する場合、その分岐度が比較的大きいために比較する塩基サイトで複数回の塩基置換が起こっている可能性があり、この影響をうけて真の系統関係が復元できない可能性がある。そこで、得られた系統樹の信頼性を検定するため、ブーツストラップ検定を1000回行った。その結果、*A. tamarense* WK S-1 と他の *A. tamarense* および *A. catenella* タイプとの分岐点での復元比率はやや低いものの、他の分岐点については比較的大きな値が得られ、これらの系統関係の信頼性を確認できた(Fig. 7)。また、塩基A, T, CそしてGの相対頻度が1/4から大きくずれているときにはその系統関係を正しく復元できない場合があることが知られているが(長谷川, 1993)、本藻のITS領域ではこのような“ずれ”は見られなかった。

本研究においてITSの塩基配列を用いて本属藻類の系統関係を明らかにしその分子分類を行ったが、これにより得られた“分子種”はときには形態分類による“形態種”に一致しなかった。このような分子分類は、アインザイムを用いた生化学的手法や免疫学的手法を用いたグルーピングによっても裏付けることができ、形態分類にのみ基づいたこれらの藻類の種の同定には問題点があると思われる。Mayr(1982)は、種を“再生産可能な集団のコミュニティーで、自然界において特有なニッチを占める生物群”と定義している。また市村(1986)は有性生殖を有する種においては、“生物種”とは相互交配が可能でその集団内にジーンプールを共有し個体間の遺伝子の交換再編が可能であり、この結果正常なF<sub>1</sub>やF<sub>2</sub>が得られる生物群と定義している。本藻のように接合型+と-を持ち有性生殖を行う種については、このような生物種概念がその種を考える上で重要であると思われるが、現時点では培養株においてその接合頻度が極めて低く、本法による種の同定は難しい状況である。しかし本研究で用いたITS領域等の遺伝子のスペーサー部位は、遺伝子コード領域に働く強い純化淘汰圧をほとんど受けないと考えられ、交配可能な集団間においては不等交差によりその領域は一様化される一方で、いったん生殖隔離により種分化が起こり個々の集団が独立に進化するとき、個々の集団内に突然変異が蓄積されその集団間で分岐的な配列を持つようになることが予想できる(木村, 1984)。本研究

において、ITS領域は種内では極めて保存的であったが、種間においてはかなり分岐していた。この事実より、本研究の結果得られた“分子種”は、本藻の“生物種”に対応している可能性があると思われる。今後本藻のような微細な藻類の分類を行うに際し、従来の形態学的分類に加えDNAの塩基配列の比較等を用いた分子生物学的手法、アインザイム分析等を用いた生化学的手法、モノクローナル抗体等を用いた免疫学的手法、さらには交配実験等を用いた生物学的手法により“種”についてのデータを蓄積し、これらを統合的に解析することにより微細な渦鞭毛藻の分類基準あるいは種の概念が構築されていくことが期待される。

## 第2節 *In situ* ハイブリダイゼーション法によるDNAプローブの培養株への応用

### 材料および方法

#### 蛍光DNAプローブを用いた*in situ* ハイブリダイゼーション法

得られた各株の塩基配列を比較した結果、ITS 1の3'末端の149bpから177bpの塩基配列が、各ITSタイプ内ではその相同性が高く、各タイプ間では著しく分岐的であることが明らかとなった。Fig. 9には、本部位について各ITSタイプのコンセンサス・シーケンスを示した。またTable 5には、本領域(ギャップを除く)26塩基中各タイプ間で何塩基異なっているかをまとめた。

	150	170
<i>A. tamarense</i>	AGTGG--TGCTGTGTTTGTG-TACGATG	
<i>A. catenella</i>	TTTGC--ATTTCTCTAGTTGCTGCAACA	
<i>A. affine</i>	ATTGCTAATGTGCTTGACTTTTACATGT	
<i>A. pseudogonyaulax</i>	GCTGCTGCCGCATGCCGAATTGTAAAATT	
<i>A. insuetum</i>	TGTTTCGTTCTTTGCTTGAAAATTGAATG	
<i>P. micans</i>	GTTCTCGAGTGGTATCCACTTGTTTATT	

Fig. 9 DNA signatures(ITS1; 149-177) specific for *Alexandrium* species.

その結果、最も置換が少ない *A. affine* と *A. catenella* 種間においても13塩基の置換が見られ、*A. catenella* と *A. tamarense* 種間においては15塩基の置換が見られた。

よって、本領域は本属藻類の種特異的なマーカーとなり得る可能性が示唆された。そこで、*A. tamarense* と *A. catenella* について本領域よりデザインし、そのアンチセンス鎖にそれぞれ相補的なPCRプライマー(TAMF1: 5'-GCTGTGTTTGTGTACGATG-3', CATF1: 5'-TTCTCTAGTTGCTGCAACA-



3')をDNA合成機を用いて合成し、それぞれのプライマーとITS 2プライマーを用いて本属6種の培養株より抽出した全DNAを鋳型としてPCRを行った。

Table 5. The numbers of different nucleotides among *Alexandrium* species in the 3' region of ITS 1 (base 149-177)

	2.	3.	4.	5.	6.
1. <i>A. tamarense</i>	15	15	16	15	18
2. <i>A. catenella</i>		13	17	14	18
3. <i>A. affine</i>			13	19	18
4. <i>A. pseudogonyaulax</i>				17	18
5. <i>A. insuetum</i>					18
6. <i>P. micans</i>					

CCATプライマー(5'-XGTTGCAGCAACTAGAGACATG-3'), CTAMプライマー(5'-XATCGTACACAAACACAGCAC-3', XはFluorePrimeの位置を示す)。これらの蛍光プローブは、ファルマシア社製NAP-10カラム続いてABI社製OPCカートリッジを用いて精製した後に、以下に示す方法で本藻に対し*in situ* ハイブリダイゼーション法(Fig. 10)を行った。

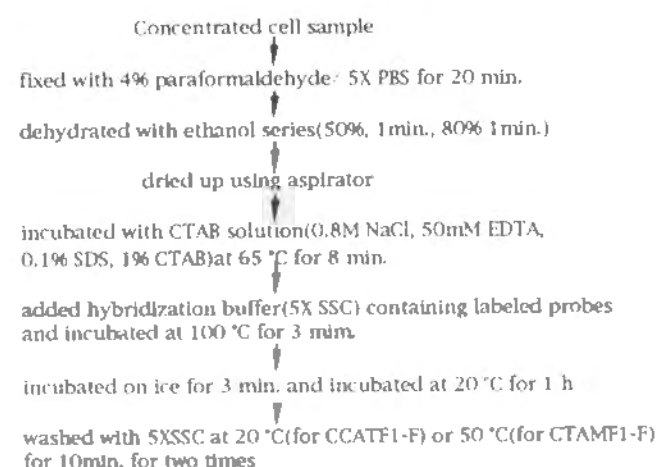


Fig. 10 Hybridization protocol for whole cells with fluorescently labeled ITS-specific probes

ピレーターを用いて熱水中ですばやくエタノールを蒸発させ試料を急速に乾燥させた。その後、CTAB溶液(1% CTAB, 0.1 % SDS, 0.8M NaCl, 50mM EDTA)400  $\mu$ Lを加え65℃にて8分処理した後、遠心分離(5,000g, 1分)して上清を除き、ここに100  $\mu$ Lの5倍量SSC(150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate)を加え細胞を懸濁した後に約10ngの蛍光プローブを加えた。これを、100℃にて3分間イン

種特異的蛍光DNAプローブ(CCATF1-FとCTAMF1-F)の作製は、ファルマシア社製の修飾FITC色素を結合させたアミダイトFluorePrimeを用い、DNA合成機を用いてDNAプライマーの5'末端にこれを導入することにより合成した。以下にその配列を示す。

まず、遠心分離(1,000g, 1分)により本藻を集藻し、そのペレットに4%パラホルムアルデヒド・5倍量PBS(Table 6)を400  $\mu$ L加え10分間固定した。これをもう一度繰り返した後に、50%エタノールに続いて80%エタノール500  $\mu$ Lを用いて各1分間脱水処理を行った。処理後、アス

キュベートした後すばやく氷上にて急冷し、その後20℃にて1時間ハイブリダイズを行った。さらに、CCATF1-Fプローブの場合は20℃にて、CTAMF1-Fプローブの場合は50℃にて15分間5倍量SSCを用いて洗浄し、これをそれぞれ2回繰り返した。これらの細胞を、蛍光顕微鏡(Nikon社製落射蛍光装置EDF)を用いてB-2励起下にて観察した。本法を行うに際し、プローブの細胞膜透過を高めるあるいはプローブがゲノムDNAへハイブリダイズしやすくすることを目的として、種々の界面活性剤で細胞を処理した。用いた5種の界面活性剤は、Triton X-100, Nonidet P-40, Sodium dodecyl sulfate(SDS), SaponinそしてCTABである。

Table 6. Composition of Phosphate Buffered Saline(PBS)

Ingredient	Concentration(/1L)
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	2.9 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
Distilled water	1000 ml
pH7.4	

## 結 果

ITS 1の3'末端の149bpから177bpの塩基配列が、各ITSタイプ内ではその相同性が高く、各タイプ間では著しく分岐的であることが明らかとなり本領域は本属藻類の種特異的なマーカーとなり得る可能性が示唆された。そこで、*A. tamarense*と*A. catenella*について本領域よりデザインし、そのアンチセンス鎖にそれぞれ相補的なPCRプライマーTAMF1あるいはCATF1プライマーとITS 2プライマーを用いて本属6種の培養株より抽出した全DNAを鋳型としてPCRを行ったところ、それぞれ*A. tamarense*と*A. catenella*に種特異的な増幅シグナルを得ることに成功した(Fig. 11)。そこで両タイプの本領域のセンス鎖にそれぞれ相補的でその5'末端を蛍光ラベルしたCCATF1-FとCTAMF1-Fプライマーを用いて、*in situ* ハイブリダイゼーション法により培養株に対してその応用を試みた。本法を行うに際し、プローブの細胞膜透過を高めるあるいはプローブがゲノムDNAへハイブリダイズしやすくすることを目的として、種々の界面活性剤で細胞を処理した。

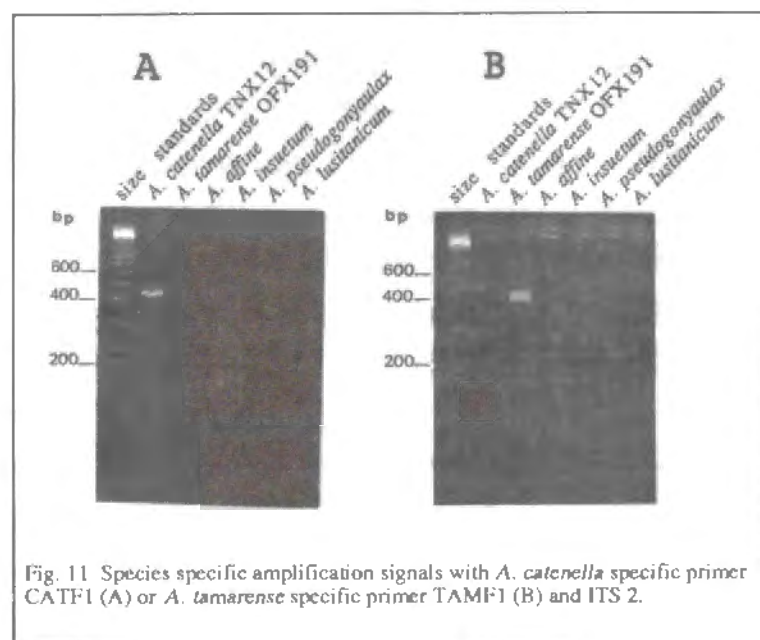


Fig. 11 Species specific amplification signals with *A. catenella* specific primer CATF1 (A) or *A. tamarensis* specific primer TAMF1 (B) and ITS 2.

用いた5種の界面活性剤Triton X-100, Nonidet P-40, Sodium dodecyl sulfate(SDS), SaponinそしてCTABのうち、CTABはそのシグナル強度を強くする上で有効であった。CTABで処理した*A. tamarensis*と*A. catenella*各4株の細胞へ2種の蛍光プローブを反応させたところ、CCATF1-Fプローブは*A. catenella*株に、CTAMF1-Fプローブは*A. tamarensis*株に高い反応性を示した(Table 7)。

さらに、*Alexandrium*属他種*A. affine*, *A. insuetum*, *A. pseudogonyaulax*そして*A. fraterculus*および他属*Prorocentrum micans*, *Amphidinium carterae*と*Heterocapsa triquetra*株へこれらのプローブを反応させた結果全く反応性を示さず(Table 8)、これら2種のプローブはそれぞれ*A. catenella*と*A. tamarensis*に反応特異性が高いことが明らかとなった。また、あらかじめDNase IあるいはRNase Aにより処理した*A. tamarensis*と*A. catenella*細胞へ両プローブを反応させた結果、RNase Aで処理した細胞のシグナル強度の減少は見られなかったものの、DNase Iで処理した細胞は全くその反応性を示さなかったことにより、これらのDNAプローブはゲノムDNAにハイブリダイズしていることが明らかとなった。また、これらのプローブによってラベルされた細胞内の位置は、細胞中央付近に存在する渦鞭毛藻特有の常に凝縮したU字型の染色体の”内側の基底部”であることも明らかとなった(Fig. 12)。

Table 7. Reactivity spectra of FITC-labeled oligonucleotide probes to various strains of phytoplanktons by *in situ* hybridization

Strains	Reactivity <sup>a</sup>	
	CTAMF1-F	CCATF1-F
<i>A. tamarensis</i> FK-788	+	-
<i>A. tamarensis</i> OFX151	+	-
<i>A. tamarensis</i> H138	+	-
<i>A. tamarensis</i> 503A-A	+	-
<i>A. catenella</i> OFX072	-	+
<i>A. catenella</i> OFY101	-	+
<i>A. catenella</i> TNY11	-	+
<i>A. catenella</i> TNY16	-	+

<sup>a</sup> Reactivity was assayed under epifluorescent microscope, +; labeled cells, -; nonlabeled cells

Table 8. Reactivity spectra of FITC-labeled oligonucleotide probes to various strains of phytoplanktons by *in situ* hybridization

Strains	Reactivity <sup>a</sup>	
	CTAMF1-F	CCATF1-F
<i>A. tamarensis</i> FK-788	+	-
<i>A. catenella</i> OFY101	-	+
<i>A. affine</i>	-	-
<i>A. insuetum</i>	-	-
<i>A. pseudogonyaulax</i>	-	-
<i>A. lusitanicum</i>	-	-
<i>A. fraterculus</i>	-	-
<i>Prorocentrum micans</i>	-	-
<i>Amphidinium carterae</i>	-	-
<i>Heterocapsa triquetra</i>	-	-

<sup>a</sup> Reactivity was assayed under epifluorescent microscope, +; labeled cells, -; nonlabeled cells

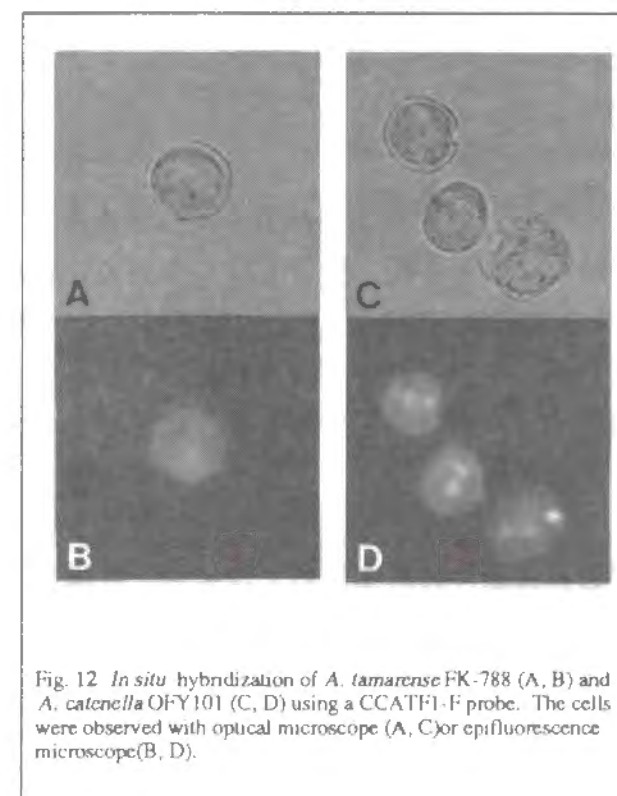


Fig. 12 *In situ* hybridization of *A. tamarensis* FK-788 (A, B) and *A. catenella* OFY101 (C, D) using a CCATF1-F probe. The cells were observed with optical microscope (A, C) or epifluorescence microscope (B, D).

今回注目したITS領域は、28S rDNA D1やD2ドメインに比べて分岐的であることが知られている。一般的に、28S rDNAは属から種レベルの系統関係を、ITS領域は種から集団レベルでの系統関係を解析するために用いられている(White *et al.*, 1990)。特に本研究においては、種特異的あるいは集団特異的な遺伝的マーカーの作成を目的としており、種内では相同性が高い一方で種間では極めて分岐的な配列を持つITS領域を用いることにより、容易にこのようなマーカーをデザインすることが可能となった。特に近似種と考えられる *A. tamarense* と *A. catenella* にそれぞれ特異的なDNAプローブを作成しこれを培養株へ応用することにより、実際に種特異的なシグナルの検出に成功した。これらのプローブは、現時点でそのシグナル強度があまり強くないなどの点が問題であるが、ゲノムDNAにハイブリダイズしていると考えられ、環境条件等によりそのシグナル強度が変化する可能性がないと考えられるので、今後ビオチン・アビジンシステムを導入することによりその強度を増幅することができれば、実際の現場試料中に含まれる本藻を1細胞レベルで正確に同定できると思われる。また、このような蛍光DNAプローブを用いて細胞を処理し、フローサイトメトリーを用いてその細胞を検出する事が可能となれば、定量性を持たせて多数の現場試料を解析することが可能となるであろう。

### 第 3 節 摘 要

(1) *Alexandrium* 属藻類より、その全DNAを抽出・精製する方法を確立した。これを鋳型として用いPCR法により、本属7種30株についてITSおよび5.8S rDNA領域を含むDNA断片の増幅に成功した。これらを数種の制限酵素を用いて消化したところ、本属種間・種内において制限酵素断片長多型(RFLP)が検出でき、本ITS1領域は本藻の分子分類を行うに際し、その“分子マーカー”となり得る可能性が示された。

(2) 本属6種24株のITS領域のDNA断片の塩基配列を決定し、各株についてこれらを比較しその系統樹を作成した結果、これらの株をそのITSタイプから7つに分けることが可能で、これらの株の系統的相互関係を明らかにすることができた。中でも、アメリカ産および日本各地6地点より分離された *A. tamarense* とアメリカ産 *A. fundyense* 株が同じブランチを形成したが、和歌山県串本産ならびにタイ産 *A. tamarense* CU-15株は、系統樹中前述のグループとは異なる

それぞれ別のブランチを形成することが明らかとなった。また、タイ産 *A. tamarense* CU-1株は *A. affine* と同じブランチを形成した。他株のITSタイプについては、形態分類による形態種と一致していた。

(3) 得られた各株の塩基配列を比較した結果、ITS1 3'末端の塩基配列(149-177bp)が各ITSタイプ内ではその相同性が高かったが、各タイプ間では著しく分岐的であることが明らかとなった。そこで本領域より *A. tamarense* と *A. catenella* にそれぞれ特異的と考えられる蛍光DNAプローブを作製し、これらを *in situ* ハイブリダイゼーション法により培養株へ応用したところ、それぞれ種特異的な反応性を示すことが明らかとなった。



### 第 3 章 モノクローナル抗体による *Alexandrium* 属藻類識別

#### 緒 言

我が国において、*Alexandrium* 属藻類とりわけ南日本を中心として発生する *A. catenella* と北日本を中心として発生する *A. tamarense* は、ゴニオトキシンやサキシトキシンといった強力な神経毒を有し、麻痺性貝毒 (PSP) の原因藻として知られている。これらの藻類の増殖により、ホタテガイ等の二枚貝が毒化し、しばしば麻痺性貝毒を日本沿岸海域において引き起こし、食品衛生上の問題のみならず近年の増養殖業の発展に大きな障害となっている。そこで、形態的に分類困難な本属藻類から、上述の有毒種を増殖の初期に正確かつ迅速に識別して、現場での対応に役立てる方法を確認することは極めて重要である。

第 2 章では *Alexandrium* 属の分子分類を rDNA の 5.8S と ITS 領域の塩基配列によって行い、形態分類において往々にして生じる混乱を整理し、この分子分類により客観的な分類が可能であることを示した。さらにこの rDNA 領域において種特異的と思われる特定の ITS 領域の DNA プローブを設定しこれらを現場試料へ応用を試みたが、これらのプローブは細胞内の DNA に対し反応するため膜透過性の問題等によりその反応性が弱いなど、現時点では *in situ* でのその適用には解決すべき問題が残された。そこで、現場試料への適用がより容易であると考えられる免疫学的手法、すなわち *Alexandrium* 属の細胞壁を抗原としたモノクローナル抗体によるその種内・種間識別を試みることにした。

細菌や藍藻、カビなどの分野では、古くからマウスを免疫することにより得られる抗体の特異的結合性を利用した免疫学的手法による種の識別が数多くなされてきた (Hamada *et al.*, 1980)。しかし当初用いられた抗血清は、ポリクローナル抗体すなわち抗原分子中の異なる抗原決定基に対する抗体の混合物であり、必ずしも目的の特異性を持つものではなかった。又抗血清の場合、不純物に対する抗体を産生させないために精製度の高い抗原を用いる必要がある、あるいは動物を免疫して採血するため 1 回に得られる血清量に限界があり、ロットによって特異性や力価に差が生じるなど問題点が多かった。抗血清の持つ欠点を克服し、単一な特異的抗体の供給により分子生物学・細胞生物学を飛躍的に発展させたのが 1975 年に発表された Köhler & Milstain のハイブリドーマ法によるモノクローナル抗体の作製である (Köhler & Milstain, 1975, Fig. 13)。生体内のリンパ球は免疫系から刺激を受けると、提示された抗原決定基に各々特異的な抗体を生産するが、このようにして分化したリンパ球は増殖力に乏しい初代

培養系細胞である。そこで Köhler & Milstain は抗体産生能を持ったリンパ球に増殖能を付与させるために、骨髄腫細胞と融合させる方法を考案した。この結果、融合細胞は抗体産生という形質と骨髄腫細胞由来の増殖能を獲得することになり、半永久的に同一の抗体を生産する事が可能になった。このモノクローナル抗体は、単一の B リンパ球由来で特定の抗原に存在する 1 つの抗原決定基だけを認識する性質を持ち、それまでの抗血清 (ポリクローナル抗体) の使用にともなっていた前述の問題点を解決した。

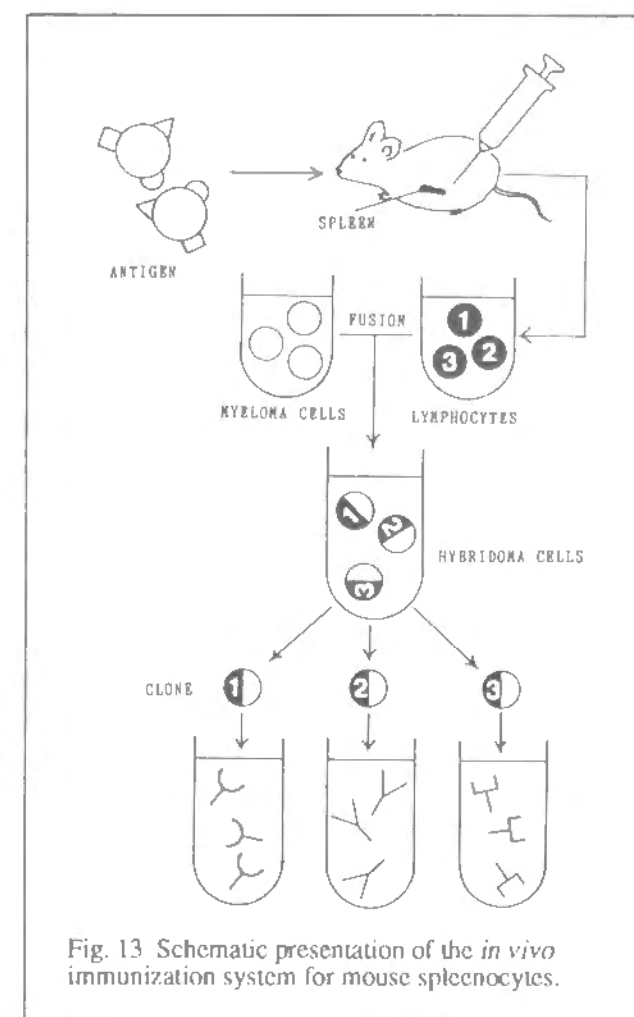


Fig. 13 Schematic presentation of the *in vivo* immunization system for mouse splenocytes.

近年このモノクローナル抗体を用いて、生物種の分類や現場試料へその応用を試みた例は多い。例えば生物種の分類には、ウイルスではサケ科魚類の魚病ウイルス salmonid viruses (Kamei *et al.*, 1990)、細菌では虫菌原因菌 *Streptococcus* 属 (Kato *et al.*, 1986, Ota *et al.*, 1987) や魚病原因菌 *Edwardsiella icturari* (Plumb *et al.*, 1988)、大型海藻類では褐藻 *Fucus serratus* (Jones *et al.*, 1985) や *Macrocystis pyryfera* (Eardley *et al.*, 1990)、微細藻類では赤潮原因藻 *Chattonella* 属 (Hiroishi *et al.*, 1988) や、*Gymnodinium* 属藻類 (Nagasaki *et al.*, 1991,

Vrieling *et al.*, 1993, Vrieling *et al.*, 1994) など、現場試料への応用例としては、赤潮原因藻 *Chattonella* 属 (Uchida *et al.*, 1989) が挙げられる。もし *Alexandrium* 属藻類の細胞表層に特異的に反応するモノクローナル抗体の作製が可能となれば、前章にて述べた DNA プローブを用いるよりも比較的簡便に現場試料中の細胞へその応用が可能と考えられ、このような抗体を現場試料に反応させた後これを

フローサイトメーターを用いて検出することができれば、迅速かつ定量的に本属藻類の検出が可能になると考えられる。

そこで本章では、まず第1節で従来のハイブリドーマ法による生体免疫法および体外免疫法を用いることにより、*Alexandrium*属藻類とりわけ有毒種*A. catenella*と*A. tamarense*の細胞表面にそれぞれ特異的に反応するモノクローナル抗体の作製を試みた。さらに第2節では、*A. catenella*と*A. tamarense*に加えて*Alexandrium*属他5種を加えたクローン・無菌株に対して得られた抗体の反応性について解析を行い、そのグルーピングを行った。また培養株に対するこれらの抗体の反応性を、フローサイトメーターを用いることにより解析し、これにより培養株レベルにおいて定性的かつ定量的に本藻の検出が可能であるか否かについて検討した。さらにこれらの免疫学的手法により得られたグルーピングの結果を、前章のDNAを用いた分子分類の結果と比較検討した。第3節では、まず培養株の様々な増殖ステージの細胞あるいは有性生殖各段階の細胞に対する各抗体の反応性を解析した後、これらの抗体の実際の現場試料への反応性を検討し、これらが現場試料中に含まれる本属藻類を検出するための“tag”として使用できるか否かについて検討した。

## 第 1 節 *Alexandrium*属藻類識別のためのモノクローナル抗体の作製

### 材 料 及 び 方 法

#### 1 実験に用いた藻類とその培養

本章に用いた藻類はTable 1に示した。

(1)1987年、当研究室において和歌山県田辺湾の底泥中のシストより分離され、無菌・クローン株(Sako *et al.*, 1990)で、福代康夫氏により形態学的に*A. catenella*と同定されたTNY7をはじめとしたTNシリーズ7株。

(2)児玉正昭氏より提供された岩手県大船渡湾の1984年と1988年の底泥から、当研究室でシストを分離し、これよりクローン・無菌化したOFシリーズ18株(Sako *et al.*, 1990)。そのうち、OFY071, OFX072, OFY101とOFX102株は福代氏により形態学的に*A. catenella*と分類され、他の株は*A. tamarense*と同定された。

(3)1978年北海道噴火湾より大島泰克氏により分離され、分譲して頂いた後、当研究室においてクローン・無菌化し、福代氏により形態学的に*A. tamarense*と同

定されたFK-788株。

(4)1987年岩手県越喜来湾より児玉氏らにより分離され、分譲して頂いた*A. tamarense* OK875-1とOK875-6株。この二株は当研究室においてクローン・無菌化した。

(5)当研究室において田辺湾産*A. catenella* TNY7株とTNX22株を交配させることにより得られたF<sub>1</sub>のTT722-3株。

(6)瀬戸内海産*A. catenella* 3株(W7, F-77, F+27)。

(7)和歌山県串本から大島氏により分離され、児玉氏に譲渡して頂いた後、当研究室にてクローン・無菌化した*A. tamarense* WKS-1株。

(8)タイ国タイ湾より分離され、児玉氏らにより譲渡して頂いた後、当研究室にてクローン化したものを、Fukuyo *et al.* (1988)により形態学的に*A. tamarense*と分類された3株。

(9)タイ国および相模湾より児玉氏らにより分離され、分譲して頂いた*A. cohorticula* 3株。

(10)瀬戸内海播磨灘より香川県赤潮研究所の吉松定昭氏により1980年に分離され、分譲して頂いた*A. affine*株。

(11)瀬戸内海播磨灘より吉松氏により1982年に分離され、分譲して頂いた後、当研究室にてクローン・無菌化した*A. pseudogonyaulax*株。

(12)瀬戸内海小豆島内海湾より吉松氏により1985年に分離され、分譲して頂いた後、当研究室にてクローン・無菌化した*A. insuetum*株。

(13)D. M. Anderson氏に譲渡していただいたアメリカ・アラスカ産*A. tamarense* PW06株、カリフォルニア産*A. catenella* BGT1、メイン湾産*A. fundyense* GTCA29、モリチェス湾産*A. tamarense* GTLI21株。これらの株は、本研究室でクローン化した。

(14)B. Reguera氏より譲渡していただいたスペイン・ビゴ産*A. tamarense* PE1V株で、当研究室にてクローン・無菌化した。

全ての株の培養には、SWII培地(Table 2, 第2章)を用い、北海道噴火湾産および岩手県大船渡湾産株については15℃にて、他の株については20℃にて標準培養条件下(14Light:10Dark, 100 mol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)で静置培養を行った。

### 2 免疫と細胞融合

#### 1 生体免疫法(*in vivo* immunization method)

免疫には、田辺湾産の*A. catenella* TNX22株、大船渡湾産の*A. catenella* OFX102



株、*A. tamarense* OFX151株、越喜来湾産*A. tamarense* OK875-1株、タイ産*A. tamarense* CU-15株を用いた。いずれの場合にも、まず対数増殖期後期の細胞(約 $10^5$ 細胞)を遠心分離( $500g \times 15$ 分)により集藻した。細胞中に含まれる有毒成分を抽出除去するために、30%エタノール溶液中に細胞を懸濁した後、これを超音波破碎機(トミー精工MODEL UR-200P)により細胞を破碎した。

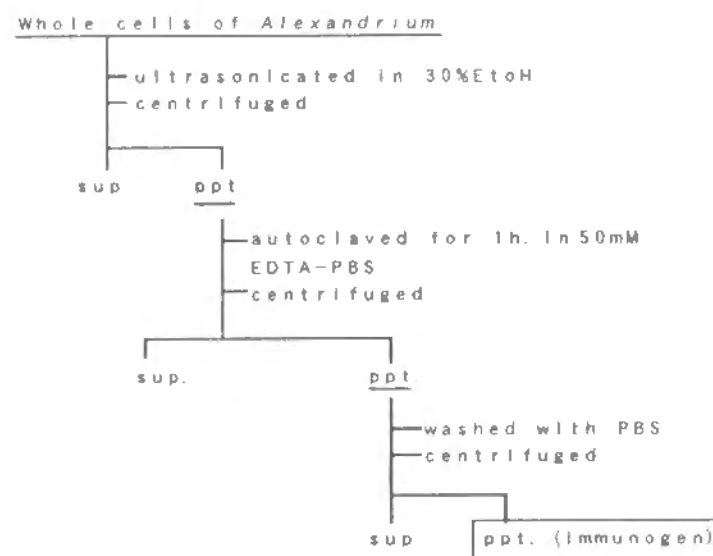


Fig. 14 Preparation diagram of immunogens.

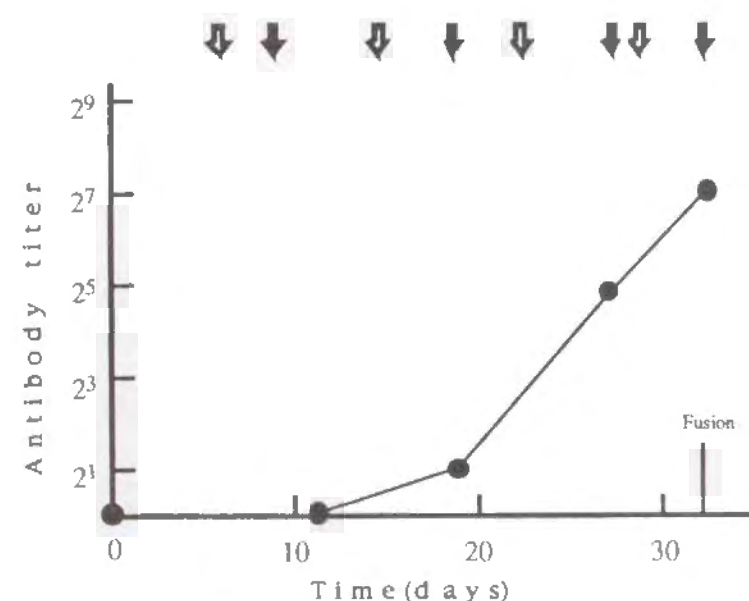


Fig. 15 Antibody titer of the serum from mouse immunized *A. catenella* OFX102 during the period of immunization. ↓ the mouse was immunized on those days. ↓ splea were tapped on those days. On day 33, three days after the last injection, spleen lymphocytes from the mouse were fused with myeloma cells.

た。免疫したマウスの尾動脈あるいは心臓より採血した血液を遠心分離( $3,000g$

この破碎液を遠心分離( $8,000g \times 10$ 分)し、得られた沈澱を1 mLのリン酸緩衝液PBS(Table 6)に懸濁し、これを抗原として一週間毎に計10回BALB/c crslsマウス5週令♀の腹孔内に注射することにより免疫した。又、上記の処理を行った日本産株を抗原としてマウスに免疫した場合、マウスの脾臓に著しい肥大現象が見られ、これらの脾細胞を用いてミエローマ細胞と細胞融合を行った場合、その融合効率は極めて低いものであった。この低い融合効率を上げるためTNX22, OFX102とOFX151株については50 mM EDTAを含むPBS中にて熱処理( $120^\circ\text{C} \cdot 1$ 時間)を行い、これを抗原として用いたところ(Fig. 14)、融合効率の上升がみられ

Table 9. Composition of RPMI1640 medium

Ingredient	Concentration(/450ml)
RPMI1640 (NISSUI)	4.68 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.9 g
Sodium pyruvate	49.5 mg
L-Glutamine	132.8 mg
Penicillin	22,500 units
Streptomycin	22.5 mg
Distilled water	450 ml
pH 7	

## 2 体外免疫法(*in vitro* immunization method)

Bossの方法(1984)にしたがって、BALB/c crslsマウス5週令♀よりその脾細胞を取り出し洗浄後、2 mM 2-メルカプトエタノールを含む10 mLのRPMI1640培地中にその脾細胞を懸濁し、2つの滅菌シャーレに分注し、ここに免疫増強剤としてムラミル・ジペプチド $200 \mu\text{g}$ を各シャーレに加えよく撹はんした。抗原としては、TNX22, OFX102, OFX151とCU-15株について、生体免

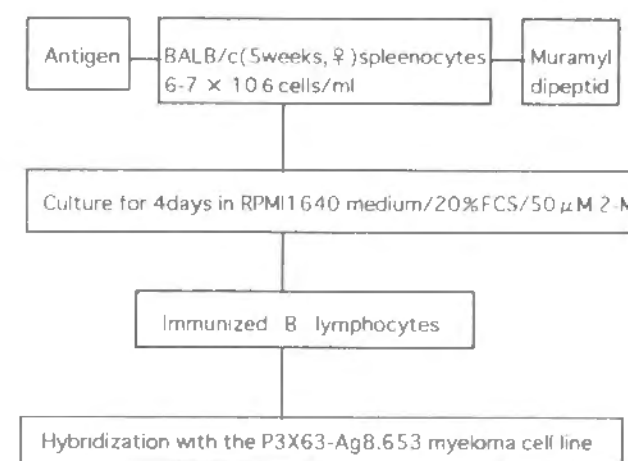


Fig. 16 A schematic presentation of the *in vitro* immunization system for mouse splenocytes.

日間ナブコインキュベーター(Model 5100)内で5% CO<sub>2</sub>・37℃にて脾細胞を感作した(Fig. 16)。

×5分)し、その上清として得られた血清画分をPBSにて段階的に希釈し、後述の間接蛍光抗体法により抗体活性の上升を確認した(Fig. 15)。十分に抗体活性の上升が確認されたマウスより、最終追加免疫刺激から約3日後その脾臓を取り出し、10%ウシ胎児血清(FCS)を含むRPMI1640培地(Table 9)の入った滅菌シャーレ内で、ステンレスメッシュ#200とシリンジを用いて脾細胞懸濁液を調製した。

疫法と同様に毒成分を抽出除去した後に50 mM EDTAを含むPBS中にて熱処理を $120^\circ\text{C} \cdot 1$ 時間あるいは $120^\circ\text{C} \cdot 3$ 分間を行ったものを用いた。この抗原を一方のシャーレには $100 \mu\text{L}$ 、もう一方のシャーレには $10 \mu\text{L}$ 加え軽く揺すってよく撹はんし、15分間静置した。その後各シャーレに5 mLの40% FCSを含むRPMI1640培地を加え軽く混ぜ、4



### 3 生体・体外免疫組合せ法

Boerらの方法(1988)にしたがって、BALB/c crslsマウス5週令早に、上記1の前半と同様な処理を行ったCU-15株を抗原として用いて1回のみ生体免疫を行い、4週間後上記2で述べた処理を行った抗原を用いて追加刺激することにより体外免疫を行った。

### 4 細胞融合法

あらかじめ、ミエローマ細胞(P3 X63-AG8.653)を10%FCSを含むRPMI1640培地を用いて37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下で培養し、対数増殖後期における細胞を調製した。このミエローマ細胞と脾細胞を血球算定盤上で計数した後、1:10の比で混合し50%ポリエチレングリコール#2,000存在下で約2分間緩やかに撹はんしながら細胞融合を行わせた。次に、Hiroishiらの方法(1988)に従って

融合細胞を96穴平底マイクロプレート(Nunc社)中においてHAT培地(Table 10)による選択培養を行った。融合を行ってから約10日後よりHAT培地よりアミノプテリンを抜いたHT培地、通常のRPMI1640培地に順次替えてゆき、ハイブリドーマが増殖してきたウェルについて後述の間接蛍光抗体法によりスクリーニングを行った。

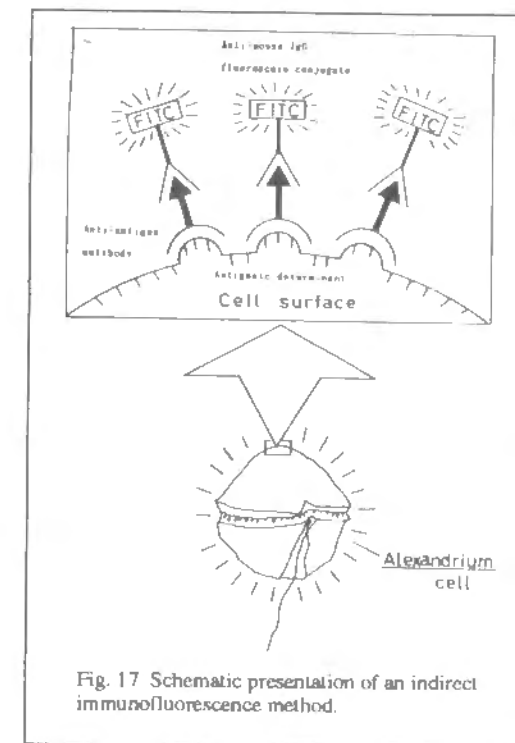
Table 10. Composition of HAT medium

Ingredient	Concentration(/200ml)
Aminopterin	35.2 $\mu$ g
Thymidine	776 $\mu$ g
Hypoxanthine	2.72 mg
RPMI1640 medium	200 ml

### 5 抗体産生細胞のスクリーニングとクローニング

ハイブリドーマのコロニーが十分に増殖したウェルの培養上清を採取し、以下に述べる間接蛍光抗体法(Fig.17)に供した。

対数増殖期後期のAlexandrium藻体を、96穴平底マイクロプレートに1ウェルあたり2000細胞となるように分注し、そのまま遠心



分離(500g, 10分)を行った。遠心分離により細胞が底に沈んだのを確認後、上清150 $\mu$ Lを静かに吸引除去し50 $\mu$ LのPBSを加え藻体を洗浄した。上澄みを50 $\mu$ L吸引除去した後にハイブリドーマ培養上清を50 $\mu$ L加え30分間反応した。2回洗浄後、2次抗体溶液(Ortho社製FITC標識ヤギ抗マウスIgG+IgM+IgA(H+L)40倍希釈液を50 $\mu$ L加え、さらに室温で20分間遮光しながら反応した。反応終了後、4回洗浄し得られたサンプルをNikon社製落射式蛍光顕微鏡を用いてB-2励起法により観察し、黄緑色の蛍光環を有する細胞を反応陽性細胞としてその割合を調べ反応の強さを示す値とした。

また、約400-500nmの波長を遮断する-550 objective filterを用いることにより藻体自体の色素(主にクロロフィル)による赤色自家蛍光を遮断し、より微弱な蛍光環も観察した。対照実験にはミエローマ細胞の培養上清を用いた。間接蛍光抗体法により陽性と判定されたウェルのハイブリドーマ細胞は、マイトマイシンCにより処理されたfeeder cells(脾細胞)を接種したウェル中で限界希釈法(岩崎ら, 1983)によるクローニングを行った後、Corster社製12穴プレートを用いて培養を行いモノクローナル抗体を含んだ培養上清を回収する一方、一部の細胞は-90℃にて凍結保存した。

### 6 抗体のクラス・サブクラスとそのライトチェーンの決定法

得られた抗体は、Zymed社製Streptavidin-Biotin System/Mono Ab ID EIA Mouse kitを用い、後述(第2節)のELISA法により、そのクラス・サブクラスとそのライトチェーンの決定を行った。

## 結 果 及 び 考 察

本研究を始めた当初、生体免疫法を行う際 *Chattonella* (Hiroishi et al., 1988) の場合と同様の方法で *Alexandrium* 培養液を遠心分離 (500g × 10分) することにより得られる藻体を PBS 中に懸濁し、これを免疫原とすると、本藻が有するゴニオトキシンやサキシトキシン等の神経毒成分のため、免疫したマウスが免疫直後に死亡する。従って、免疫に先立ってその有毒成分を抽出除去するために 30% エタノール中でその細胞を超音波破碎処理した。これらの解毒処理を行った細胞を抗原としてマウスに免疫した結果、免疫直後に死亡するマウスはほとんど見られなくなったものの、免疫回数を重ねるに従って、その脾臓が大きく肥大する傾向が見られ、これら肥大した脾臓を用いてミエローマ細胞と細胞融合を行ったところ、その融合効率は極めて低いものであった (その効率の一例: 10 ウェル / 240 ウェル)。この生体免疫法により、数百匹のマウスに *A. catenella* OFX102 株と *A. tamarense* OK875-1 株を免疫することによって、抗体 M102-2 と M8751-1 をそれぞれ得た。また、少しでも融合効率を上げるために、有毒成分を抽出除去した *Alexandrium* 藻体を、熱処理を行い抗原として用いたところ、その融合効率は 372 / 1200 とやや改善がみられた (Table 11)。

Table 11. Comparison of *in vivo* and *in vitro* immunization protocols

Immunization methods	Immunization dosage (protein $\mu$ g)	No. of growth positive wells No. of total tested wells	No. of specific antibodies positive wells (by IFA)
<i>In vivo</i>	65	372 / 1200	1
<i>In vitro</i>	1.1	669 / 1200	4

この方法で *A. catenella* TNX22 株より抗体 M22-1 が得られた。しかし一般の免疫原を用いた場合に比較して、この方法によっても低い融合効率しか得られなかった。

このような生体免疫法の欠点を補う方法として、体外免疫によるモノクローナル抗体法があり、1980 年 Luben と Mohler らによって報告された。それ以来、現在までに多くの研究者により体外免疫法が試みられ、従来の生体免疫法に比較してその利点のいくつかが明かとなった。例えば、免疫に要する時間が極端に少なくすむ点、免疫に要する抗原量が極端に少なくすむ点、ハイブリドーマの高い出現率が高頻度で得られることが多い点、あるいは有毒な抗原を用

いても抗体が得られる場合がある点等が挙げられる。そこで本研究において、このような長所を持った体外免疫法を用いて *Alexandrium* 属に反応するモノクローナル抗体の作成を試みた。その結果、用いた抗原量は約 1 / 50 と少なくすみ (Table 11)、通常の免疫原を用いた場合と同様の融合効率 (669 / 1200, Table 11) がみられ、*A. catenella* TNX22 株より抗体 M22-2, M22-3、*A. catenella* OFX102 株より抗体 M102-3、*A. tamarense* OFX151 株より M151-1 が得られた (Table 12)。

Table 12. List of monoclonal antibodies reactive to *Alexandrium*

Antigens	Moab	Immunization methods	Class subclass	Light chain
TNX 22	M22-1	<i>in vivo</i>	IgM	$\kappa$
TNX 22	M22-2	<i>in vitro</i>	IgM	$\kappa$
TNX 22	M22-3	<i>in vitro</i>	IgM	$\kappa$
OFX102	M102-2	<i>in vivo</i>	N.D.	N.D.
OFX102	M102-3	<i>in vitro</i>	IgM	$\kappa$
OK875-1	M8751-1	<i>in vivo</i>	IgG <sub>1</sub>	$\kappa$
OFX151	M151-1	<i>in vitro</i>	IgM	$\kappa$
CU-15	MT15-1	<i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>	IgM	$\kappa$
CU-15	MT15-2	<i>in vivo</i>	IgM	$\kappa$
CU-15	MT15-4	<i>in vivo</i>	IgM	$\kappa$

N.D., not determine

また、抗体のクラス・サブクラスを Zymed 社製 Streptavidin-Biotin System / Mono Ab ID EIA Mouse kit を用いて解析した結果を Table 12 に示した。生体免疫法により得られた 5 抗体のうち抗体 M8751-1 は IgG<sub>1</sub> であったが、M22-1, MT15-2, MT15-4 抗体は IgM であった。一方、体外免疫法より得られた 4 抗体のうち抗体 M22-



2, M22-3, M102-3とM151-1はいずれもそのクラスはIgMであった。一般に、体外免疫法で得られるモノクローナル抗体はその90%前後がクラスIgMであると言われており、これが体外免疫法の1つの問題点とも言われている。そこでこの点を解決するために、Boerらは生体免疫法と体外免疫法との組合せ法を1988年に報告している。この方法では、初回生体免疫を行った後、4週間後にさらに体外免疫法を行うと、得られる抗体は80%前後の確率でクラスIgGであると言うものである。本研究においても、タイ産*A. tamarense*CU-15株を用いて生体・体外免疫組合せ法を試み抗体MT15-1を得た。しかし本抗体のクラスはIgMであった(Table 12)。

各ハイブリドーマを-90℃で凍結保存し、凍結細胞は1年に1回融解し増殖させた後、再び凍結保存した。M102-2産生細胞は長期間保存できずに失活してしまい、Table 13で用いた17株の反応性を調べた後、使用できなくなった。

又、体外免疫法により得られた抗体産生細胞において、再び融解・増殖させた場合、抗体価の低下がしばしば見られ、再クローニングを行ったがそのまま抗体を産生しなくなる場合も見られた。体外免疫法では非常に短い免疫期間(4日間)で脾細胞を免疫するため、B細胞が十分にプラズマ細胞にまで分化できておらず未熟な段階で細胞融合していると考えられ、長時間の培養を経る間に抗体産生能を失ってしまうのかも知れない。

Table 11に示すように、得られたハイブリドーマに対して*Alexandrium*細胞表面に反応する陽性細胞の比率は他の研究に比較して低い値である。例えば、1988年Jonesらが報告した褐藻ヒバマタ(*Fucus*属)の表面を認識するモノクローナル抗体の作成においては、得られたハイブリドーマと陽性細胞の比率は12/1000と*Alexandrium*属藻類の抗体作製効率の場合の約10倍前後となっている。この原因としては、本属藻類をマウスに免疫した場合、Fig.15に示すように抗体価の上昇がみられる場合もあるが、抗体価の上昇がほとんど見られないケースもしばしば見られ、これが陽性細胞の比率の低さに影響していると思われる。そこで抗体価を上昇させるため、藻体をフロインドアジュバンド処理(Jones *et al.*, 1988)を行った後に、マウスに免疫したがほとんど有為な差はみられなかった。

間接蛍光抗体法を用いて蛍光顕微鏡下で*Alexandrium*属藻体を観察した結果の一例を、Fig.18に示した。ほとんどの場合細胞表層に存在する外殻殻板に黄緑色のコロナがみられたが、抗体M22-3の場合外殻殻板のみならずその細胞膜にも反応性がみられた。また、抗血清を用いた時点では鞭毛にも反応性がみられる場合もあったが、得られたモノクローナル抗体はいずれも顕微鏡下では鞭毛に反応性が認められなかった。

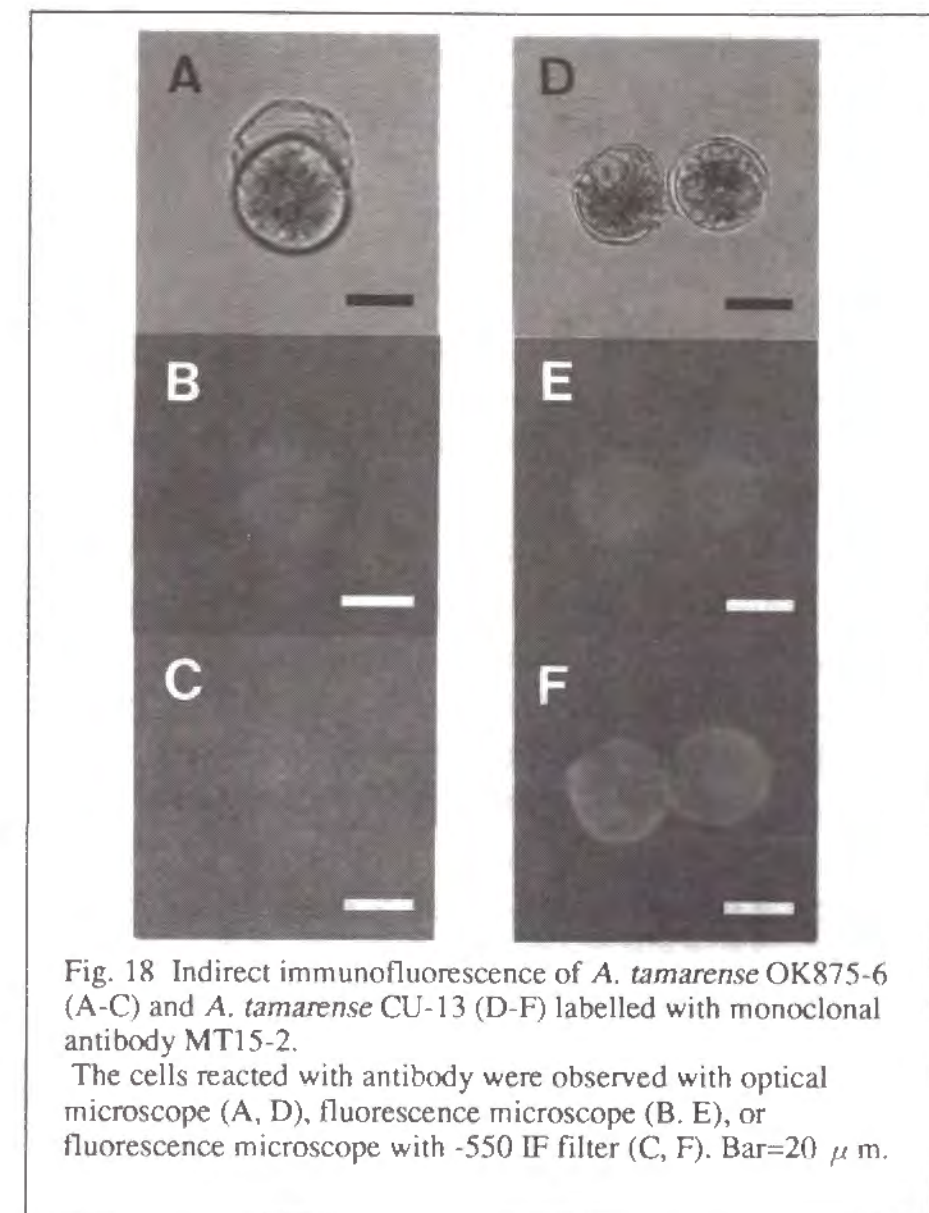


Fig. 18 Indirect immunofluorescence of *A. tamarense* OK875-6 (A-C) and *A. tamarense* CU-13 (D-F) labelled with monoclonal antibody MT15-2.

The cells reacted with antibody were observed with optical microscope (A, D), fluorescence microscope (B, E), or fluorescence microscope with 550 IF filter (C, F). Bar=20  $\mu$ m.

## 第 2 節 得られた抗体と培養株との反応性

### 材 料 及 び 方 法

前節で調製されたモノクローナル抗体の、*Alexandrium*属各株に対する反応性を、ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)法、ドットイムノアッセイ法、ウ



エスタンプロテイング法あるいは間接蛍光抗体法を用いて蛍光顕微鏡（前節にて記述）またはフローサイトメーターにより分析した。間接蛍光抗体法を用いて、蛍光顕微鏡により各抗体の反応性を判定するに際し、陽性細胞の比率をその反応性とした。以下に、これらの方法（間接蛍光抗体法を除く）について説明する。

### 1、各抗体の反応検出のためのELISA法とドットイムノアッセイ法

ELISA法。まずプレート作成のためAlexandrium藻体培養液150mLを、遠心分離(500g×10分間)し得られた藻体に2 mLのPBSを加え、氷冷しながら最大出力で15秒間ずつ計10回の超音波破碎処理を行った後、遠心分離(3,000g×10分間)し、その上清を粗細胞抽出液として抗原に用いた。これを、Bio-Rad社製プロテインアッセイキットを用いてそのタンパク質量を分光光度計を用いて測定した後、200  $\mu$ g protein/mLとなるように20mM Tris-HCl(pH8.0) bufferを用いて希釈した。これを、Nunc社製Immunoplate Maxisoupe F96の左端第1列に100  $\mu$  L加えた。第2列以後には0.05M炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH9.5)を50  $\mu$  Lずつあらかじめ分注しておき、その後第1列より50  $\mu$  Lとり第2列へ加えよく攪はんした後に、さらに50  $\mu$  Lを第3列へと順次2倍希釈を行って第11列まで希釈を行った。第12列には対照実験としてPBSを50  $\mu$  L分注した。このプレートを37℃にて2時間インキュベートし、抗原の固相への吸着を行った。又、抗原の固相への非特異的結合を防ぐため、インキュベート終了後1%牛血清アルブミン(BSA)を含むPBSで各ウェルを1回洗浄後、同液を200  $\mu$  Lずつ各ウェルに加え4℃にて1晩インキュベートし、ブロッキングを行った。インキュベート後さらに1回洗浄した後、各ウェルに抗体液を加え37℃にて2時間インキュベートし抗体の固相への結合を行った。その後0.15%Tween20を含むPBSにより2回洗浄した後、Zymed社製Peroxidase Conjugated Goat anti-MouseIgGまたはIgMを2%BSAを含むPBSで1000倍に希釈した液を各ウェルに50  $\mu$  Lずつ加え、37℃にて1時間インキュベートした。4回洗浄後、基質液(10mg 2,2'-アビジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS),12.8  $\mu$  L 30% $H_2O_2$ ,12.8mlクエン酸緩衝液(57mMクエン酸,47mMクエン酸三ナトリウム))を100  $\mu$  Lずつ各ウェルに加え酵素基質反応による発色をMicroplate Reader(Bio-Rad社製Model450)を用い、405nmの吸光度を測定した。

ドットイムノアッセイ法：Smithら(1984)の方法に従った。前述と同様にして得られた粗細胞抽出液をPBSを用いて希釈し、ニトロセルロースメンブレン上に、1ドットあたり1  $\mu$  Lとなるようにマイクロピペットで添加し風乾した。

本ニトロセルロースメンブレンを2%BSAを含むPBSでブロッキングした後、1次抗体を20分間37℃にて反応させ、その後本bufferで2回洗浄後、前述の2次抗体500倍希釈液中で反応した。このメンブレンをPBS bufferで3回洗浄後、基質液を含む5 mL Tris-HCl(pH 8.0) buffer(85 mM Diaminobenzidine tetrachloride, 8.4 mM NiCl<sub>2</sub>,15  $\mu$  L 30%  $H_2O_2$ )中でインキュベートし、ドット上の発色を肉眼で判定した。対照実験では1次抗体のかわりにミエローマ培養上清を用いた。

### 2、抗体のフローサイトメトリー

使用したフローサイトメーターは、Coulter社製EPICS ELITE Flow Cytometerである。本機は、ストリーム中に試料を流しこれにレーザーを照射して、試料より発せられる蛍光および散乱光をフォトマルチプライヤーにより検出・測定するものである。励起レーザーとして488nmアルゴンレーザーを用い、前方・側方散乱光に加え520-530nmのFITC蛍光域と670-680nmのクロロフィル自家蛍光域を検出できるようにそのフィルターセットアップを行った。まず、Alexandrium属の細胞を2%パラホルムアルデヒドにより固定した後、抗体M8751-1を用いて間接蛍光抗体法により細胞をラベルした。本法により処理した細胞を、試料の大きさに相関があるとされる前方散乱光とクロロフィル赤色自家蛍光量の相関により、本藻体と思われる領域にゲートをかけ、ゲート内の細胞についてFITC緑色蛍光量を測定した。

### 3、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)とウエスタンプロテイング法

各株の対数増殖後期の細胞懸濁液2 Lを500gで10分間遠心分離して集藻し、得られた藻体にSDS処理液(10% ショ糖,10% SDS,10% 2-メルカプトエタノール/10mM リン酸buffer, PH7.0)を2 mL加え氷冷しながら超音波破碎処理を行った。これを8,000gにて10分間遠心分離し、得られた上清を泳動用試料とした。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動はATTO社のミニスラブを用いLaemmli (1970)の方法に従って行った。10%ポリアクリルアミドゲルを用いて、室温下、20 mAの定電流で泳動を行った。粗タンパク質染色パターンの比較にはBethesda社製SDS分子量マーカーを、ウエスタンプロテイング法の際にはSigma社製ブレステインDSDS分子量マーカーを用いた。タンパク染色はCoomassie Brilliant

Blueにより行った。泳動後の転写は、Khyse-Anderson(1983)の方法に従ってニトロセルロースメンブレンへの平行転写により行った。まず、ゲルをBjerrum and Schafer-Nielsen転写緩衝液(48mM Tris-HCl, 39mMグリシン, 20%メタノール, pH7.0)中に浸し約15分間緩やかに振とうし、SDSの除去とゲルの平衡化を行った。あらかじめ適当な大きさの濾紙とニトロセルロースメンブレンも転写液に漬けておき、Bio-Rad社製Transblot SD セミドライプロテイング装置の陽極側に、転写液に浸しておいた濾紙3枚を重ねて敷き、そのあいだの気泡をぬいた。この上にニトロセルロースメンブレンをのせ気泡を抜いた後、さらに濾紙を敷き気泡を抜いた。陰極側の電極をセットし、プロテイング用パワーサプライ200/2.0(Bio-Rad社製)により15V30分間転写を行った。転写効率の確認は、ニトロセルロースメンブレン上のプレスティンドSDS分子量マーカーの存在を、目視することによって行った。ニトロセルロースメンブレンの免疫染色はドットイムノアッセイ法の操作手順にしたがった。また、用いた抗体M8751-1は、Bio-Rad社製アフィゲルプロテインAMAPS-IIキットにより精製したものをを用いた。

## 結 果

### 1. *A. tamarense*, *A. fundyense*と*A. catenella*株への各抗体の反応性

日本産*A. tamarense*ならびに*A. catenella*株より得られた7抗体の、日本産*A. tamarense*と*A. catenella*28株に対する反応性を、間接蛍光抗体法により解析した結果をTable13に示した。日本産およびタイ産*A. tamarense*ならびに日本産*A. catenella*株より得られた7抗体の、アメリカ産、スペイン産およびタイ産*A. tamarense*, *A. fundyense*と*A. catenella*株に対する反応性を、間接蛍光抗体法により解析した結果をTable14に示した。これらの株に対する反応は、その外殻殻板のみならず細胞膜にも認められた。

抗体M102-2は、大船渡湾株として免疫に用いたOFX102株や、OFY101, OFY071とOFX072株に50-100%の高い反応性を示した。又、田辺湾株のTNX9, TNY11, TNX12株とも50-100%の高い反応性を示し、その蛍光環の強度も比較的強くみられた。また、TNY7, TNX22株とは30-50%反応した。一方OFX034とOFY045株には10-30%反応するがその蛍光環はきわめて薄く視認が辛うじてできる程度であり、OFX031株をはじめとして他株とは反応性が認められなかった。以上の結果により、抗体M102-2は大船渡湾の形態学的に*A. tamarense*と分類されている9株には反応性をほとんど示さないものの、大船渡湾産4株あるいは田辺

湾産5株の*A. catenella*には比較的高い反応性を示した。しかし残念ながら本抗体は、その産生ハイブリドーマが死滅したために充分量を得ることができず、全ての株に対する反応性を調べることはできなかった。

Table 13. Reactivity spectra of 7 monoclonal antibodies to several strains of *Alexandrium* by an indirect immunofluorescence method

Strains	Reactivity						
	M102-2	M8751-1	M22-1	M22-2	M22-3	M102-3	M151-1
TNY 7	±	±	++	++	++	++	++
TNX 9	++	-	++	++	++	++	+
TNY 10		-	++	+	++	++	++
TNY 11	+++	-	++	++	++	+++	++
TNX 12	++	±	++	++	++	++	++
TNY 16		±	+++	++	++	++	+++
TNX 22	+	±	++	+	++	++	+
OFY031	-	+++	++	++	++	++	++
OFX034	±	+++	+	++	+	++	+
OFY041	-	+++	++	++	+	+	++
OFY045	±	+++	++	++	++	++	++
OFX051	-	+++	++	++	++	++	++
OFY054		+++	++	++	++	++	++
OFY071	+++	±	++	++	++	++	++
OFX072	++	±	++	++	++	++	++
OFY101	+++	-	++	++	++	+++	++
OFX102	++	±	++	++	++	+++	++
OFX151	-	+++	++	++	++	++	+++
OFY152	-	+++	+	++	++	++	++
OFY161	-	+++	++	++	++	++	++
OFX162	-	+++	+	++	+	++	+
W-7		±	+	+	+	++	+++
F+27		-	++	++	++	+	++
F-77		-	++	+++	+	++	++
FK-788		+++	++	++	++	++	++
OK875-1		+++	++	++	++	++	++
OK875-6		+++	++	++	++	++	++
WKS-1		++	++			++	+++

+++ positive cell ratio 80-100%; ++ 50-80%; + 30-50%; ± 10-30%; - 0%



Table 14. Reactivity spectra of 7 monoclonal antibodies to several strains of *Alexandrium* by an indirect immunofluorescence method

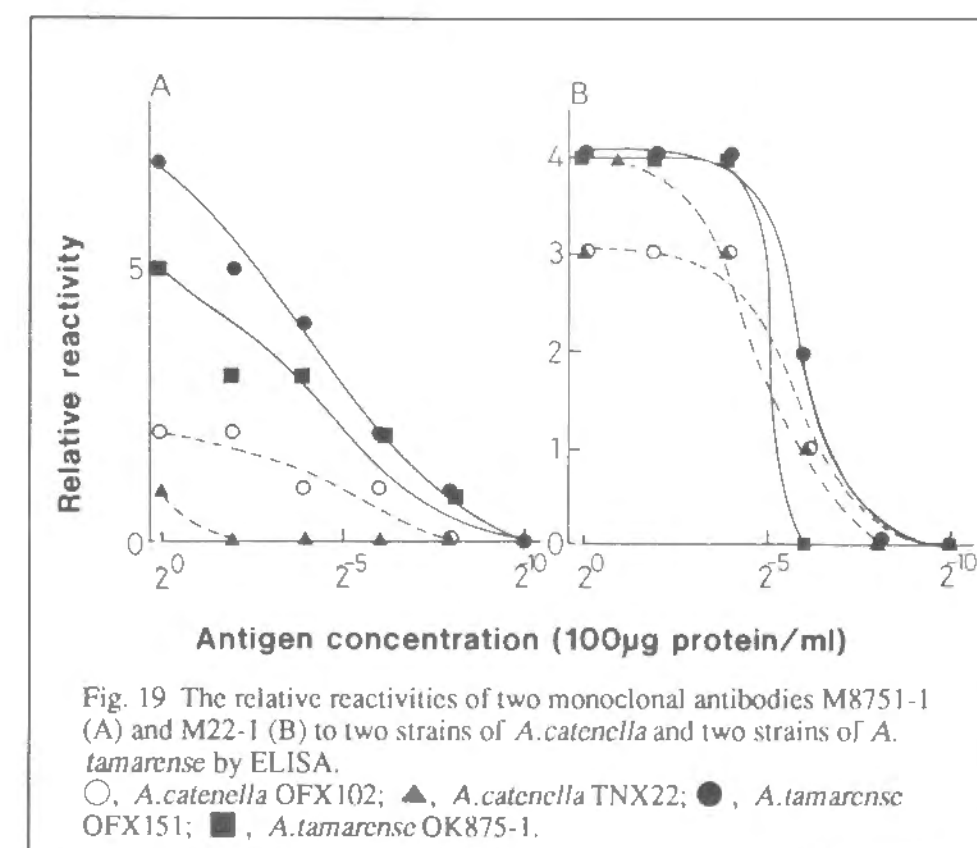
Strains	Reactivity						
	M8751-1	M22-1	M151-1	M102-3	MT15-1	MT15-2	MT15-4
OFX151	+++	++	+++	++	++	-	-
BGT1	++	++	++	+	+++	-	±
PW06	++	+++	+++	+	+++	-	-
GTLI21	++	++	+++	+	++	-	-
GTCA29	++	+++	+++	++	+++	-	-
PE1V	++	++	++	++	++	-	±
CU-13	-	+	-	-	+++	+++	+++
CU-15	-	+	±	-	+++	+++	+++

+++ positive cell ratio 80-100%; ++ 50-80%; + 30-50%; ± 10-30%; - 0%.

越喜来湾より分離され形態学的に *A. tamarense* と分類されている OK875-1 株より得られた抗体 M8751-1 は、田辺湾産 7 株、大船渡湾産 4 株、瀬戸内海産 3 株の *A. catenella* 計 14 株とは 0-30% と弱い反応性を示したが、形態学的に *A. tamarense* と分類されている噴火湾産、越喜来湾産、大船渡湾株 14 株およびアメリカ産 *A. catenella* 株、*A. fundyense* 株さらに *A. tamarense* 2 株に 50-80% と高い反応性を示した。さらに、本抗体は日本産 *A. tamarense* WKS-1 株とスペイン産 *A. tamarense* 株にも、50-80% の反応性を示した。一方、本抗体はタイ産 *A. tamarense* 2 株には全く反応性を示さなかった。また、ELISA 法を用いて本抗体と *A. tamarense* OFX151, OK875-1 の 2 株、*A. catenella* として TNX22, OFX102 の 2 株計 4 株との反応特異性についての解析したところ、OFX151 株とは非常に高い反応性がみられ、OK875-1 株とも OFX151 株に比較してやや低い反応性がみられた。OFX102 株とはさらに低い反応性しか見られず、TNX22 株とはほとんど反応性が認められなかった (Fig. 19)。

田辺湾産 *A. catenella* TNX22 株より得られた抗体 M22-1, M22-2, M22-3 と大船渡湾産 *A. tamarense* OFX151 株より得られた M151-1、*A. catenella* OFX102 株より得られた M102-3 は、いずれも間接蛍光抗体法により日本産 *A. catenella* と *A. tamarense* 計 28 株全てと同程度に反応した。このうち抗体 M22-1 は、タイ産 2 株に対しても 30-50% の反応性を示したが、抗体 M151-1 と M102-3 はいずれもタイ産 2 株にはほとんど反応性を示さなかった。さらに ELISA 法を用いて抗体 M22-1 の、先

述の 4 株 (OFX151, OK875-1, TNX22 と OFX102) に対する反応性を解析した結果、本抗体はこれらの 4 株に同程度の反応性を示した (Fig. 19)。



タイ産 *A. tamarense* CU-15 株より得られた抗体 MT15-1 は、タイ産 2 株に 80-100% と非常に高い反応性を示し、日本産株にも 50-100% と高い反応性を示した。それに対し、同株より得られた抗体 MT15-2 と MT15-4 は、タイ産 2 株には 80-100% と非常に高い反応性を示したが、日本産株とはまったく反応性を示さなかった (Table 14)。Fig. 18 には、このうち抗体 MT15-2 を *A. tamarense* 日本産株 (OK875-6) とタイ産株 (CU-13) について間接蛍光抗体法により処理し、これを蛍光顕微鏡により観察した結果を示した。一方、抗体 M102-3 と MT15-1 は日本産、タイ産のいずれの株にもほぼ同等の反応性を示した。さらに ELISA 法を用いて、日本産あるいはタイ産株より得られた抗体の、タイ産あるいは日本産株への反応性を解析した。その結果、抗体 M8751-1 は、日本産株のうち噴火湾、越喜来湾、大船渡湾産 3 株には高い反応性を示したが、串本とタイ産株には反応性がみられなかった (Fig. 20)。それに対し、抗体 MT15-2 は、日本産 4 株いずれの株に対しても反応性がみられず、タイ産株にのみ高い反応性を示した (Fig. 20)。



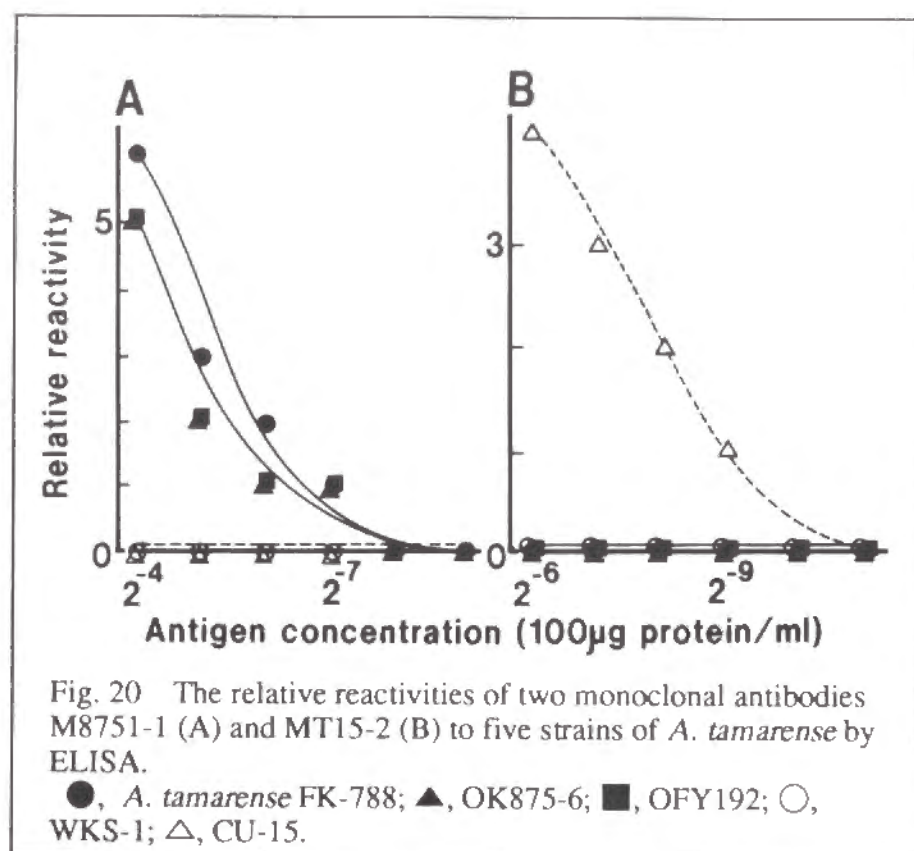


Fig. 20 The relative reactivities of two monoclonal antibodies M8751-1 (A) and MT15-2 (B) to five strains of *A. tamarensis* by ELISA.  
●, *A. tamarensis* FK-788; ▲, OK875-6; ■, OFY192; ○, WKS-1; △, CU-15.

ウエスタンブロッティングによる抗原解析を行う前段階としてSDS-PAGEによる全タンパク質染色パターンを、日本産 *A. catenella* と *A. tamarensis* さらにはタイ産 *A. tamarensis* 株について行った結果を、Fig. 21 に示した。全タンパクの泳動パターンについて、日本産 *A. catenella* と *A. tamarensis* の株間には低分子側(約15kd)のメインバンドが前者は明らかに2本存在するのに対し後者は1本しか存在しないことにより、明かな差異がみられた。また他のバンドに関しても両種は明らかに異なるバンドパターンを示した。タイ産と日本産 *A. tamarensis* 株について全タンパクの泳動パターンを比較した結果、両者の株間には大きく異なるバンドパターンが見られた(Fig. 21)。低分子側のメインバンドは、噴火湾・越喜来湾・大船渡湾産5株についてその分子量が約15kdと一致したが、タイ産株については約20kdとやや高分子側にみられた。他のタンパクバンドについても、日本産株とタイ産株間には大きく異なるバンドパターンが見られた。さらにタイ産株の泳動パターンは、日本産 *A. catenella* のそれとも明確に区別できた(Fig. 21)。さらにFig. 22には、*A. tamarensis* CU-15株に加えて、*Alexandrium* 属他4種のSDS-PAGEによる全タンパク質の泳動パターンを示し

た。この結果、これら5種の泳動パターンはお互いに明確に区別することができた。

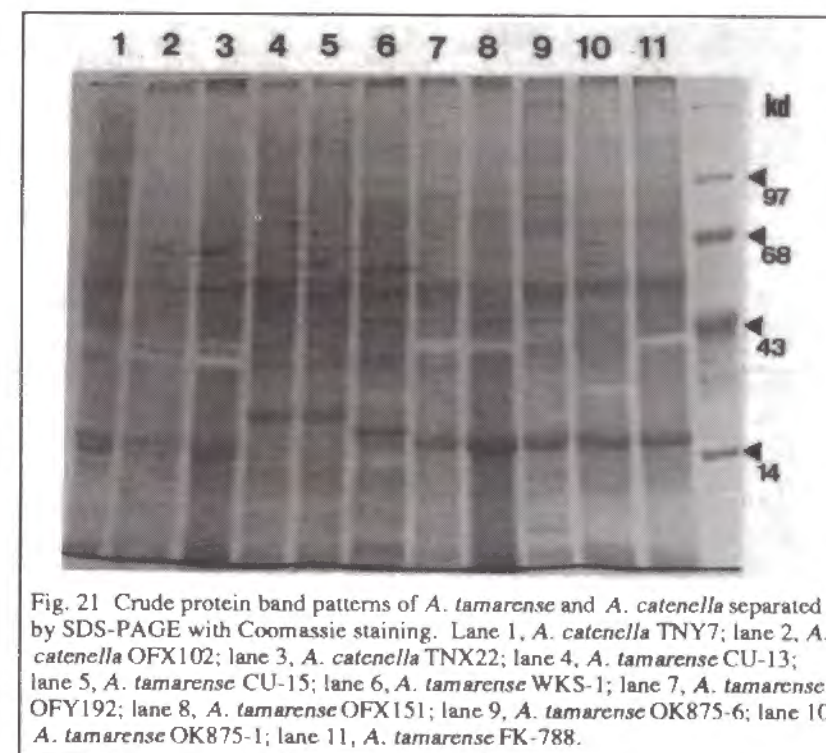


Fig. 21 Crude protein band patterns of *A. tamarensis* and *A. catenella* separated by SDS-PAGE with Coomassie staining. Lane 1, *A. catenella* TNY7; lane 2, *A. catenella* OFX102; lane 3, *A. catenella* TNX22; lane 4, *A. tamarensis* CU-13; lane 5, *A. tamarensis* CU-15; lane 6, *A. tamarensis* WKS-1; lane 7, *A. tamarensis* OFY192; lane 8, *A. tamarensis* OFX151; lane 9, *A. tamarensis* OK875-6; lane 10, *A. tamarensis* OK875-1; lane 11, *A. tamarensis* FK-788.

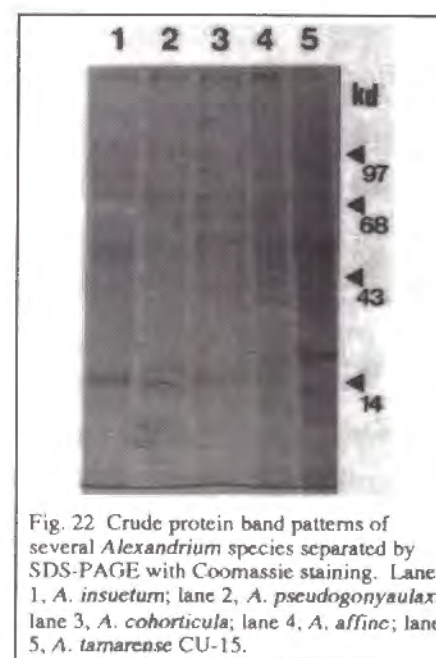
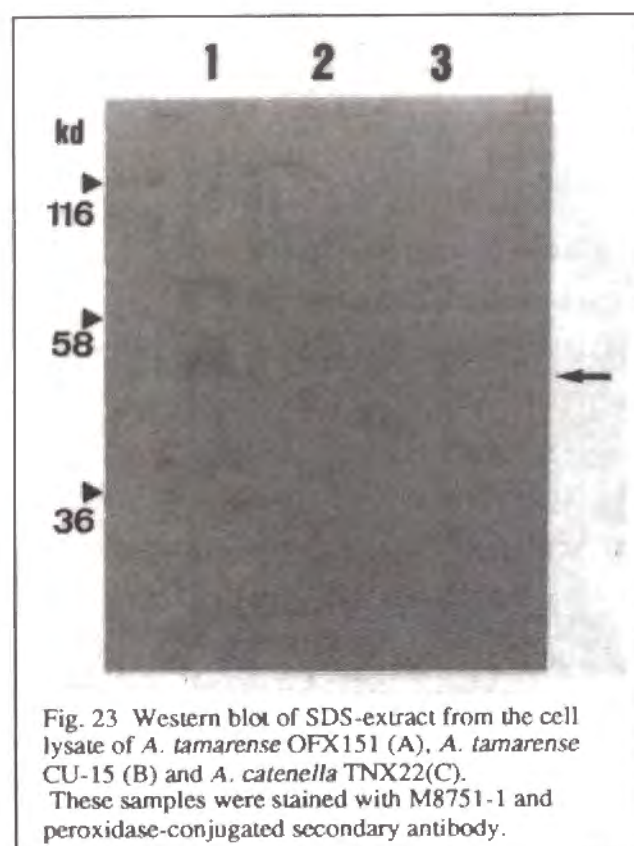


Fig. 22 Crude protein band patterns of several *Alexandrium* species separated by SDS-PAGE with Coomassie staining. Lane 1, *A. insuetum*; lane 2, *A. pseudogonyaulax*; lane 3, *A. cohorticula*; lane 4, *A. affine*; lane 5, *A. tamarensis* CU-15.

Fig. 23には抗体M8751-1を用いて *A. tamarensis* OFX151, *A. catenella* TNX22 としてタイ産 *A. tamarensis* CU-15株に対する反応性をウエスタンブロッティング法により解析した結果を示した。この結果、抗体M8751-1の認識する抗原分子は日本産 *A. tamarensis* OFX151株には存在するが、*A. catenella* TNX22株やタイ産 *A. tamarensis* CU-15株には存在が認められないことにより、本抗原分子は日本産 *A. tamarensis* に特異的に存在する可能性が示された。本抗原分子の大きさは、OFX151株の場合約50kdであることが示された(Fig. 23)。





## 2. *Alexandrium*属 6 種の株と各抗体との反応性

*A. catenella*と*A. tamarensis*の各株に加えて、*A. affine*, *A. cohorticula*, *A. pseudogonyaulax*と*A. insuetum* 6 種計8株と 8 抗体との反応性を間接蛍光抗体法により解析した結果をTable 15に示した。

抗体M8751-1は、*A. affine*と*A. pseudogonyaulax*株には反応性を示さず、*A. insuetum*株とは10-30%の反応性を、*A. cohorticula*株とは外殻殻板とは反応せず細胞膜と10-30%の反応性を示した。M22-1は、*A. pseudogonyaulax* 株には反応性を示さず、*A. insuetum*株と*A. affine*株に50-80%の反応性を示し、*A. cohorticula*株とは細胞膜にのみ50-80%の反応性を示した。抗体M22-3は、*A. pseudogonyaulax* 株に反応性を示さず、*A. cohorticula*株や*A. insuetum*株の外殻殻板と明らかに10-30%の反応性を示し、*A. affine*株には50-80%の反応性を示した。抗体M151-1は、*A. pseudogonyaulax*株に反応性を示さず、*A. affine*株の細胞膜と10-30%の反応性を、*A. insuetum*株とは50-80%の反応性を、*A. cohorticula*とはその細胞膜にのみ30-80%の反応性を示した。M102-3は、*A. affine* 株と*A. insuetum*株には50-80%の

反応性を示したが、*A. cohorticula*株と*A. pseudogonyaulax*株には反応性を示さなかった。MT15-1は、*A. pseudogonyaulax*以外の7株に50-100%と高い反応性を示した。MT15-2は、*A. insuetum*に10-30%の反応性がみられるものの、他7株いずれにも反応性を示さなかった。抗体MT15-4は、タイ産*A. tamarensis*のみならず*A. cohorticula*と*A. affine*株に50%以上の高い反応性を示した。

Table 15. Reactivity spectra of 8 monoclonal antibodies to several strains of *Alexandrium* by an indirect immunofluorescence method

Isolates	Reactivity							
	M8751-1	M22-1	M22-3	M151-1	M102-3	MT15-1	MT15-2	MT15-4
<i>A. tamarensis</i> OFX151	+++	++	++	+++	++	++	-	-
<i>A. catenella</i> TNX22	±	++	++	++	++	++	-	-
	M	T	M	T	M	T		
<i>A. cohorticula</i> CU-8	±	-	++	-	±	+	-	++
<i>A. cohorticula</i> CU-11	±	-	++	-	±	++	-	++
<i>A. cohorticula</i> MMBS8811-1	±	-	++	±	±	++	-	+++
<i>A. insuetum</i>	±	++	±	++	++	+++	±	-
<i>A. affine</i>	-	++	++	±	++	++	-	++
<i>A. pseudogonyaulax</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

+++ positive cell ratio 80-100%; ++ 50-80%; + 30-50%; ± 10-30%; - 0%

M; membrane, T; thecal plates

またELISA法を用いて、6 種 7 株に対する各抗体の反応性についての解析を行った。M8751-1は、日本産*A. tamarensis*にのみ反応し他株には反応性を示さなかった。M22-1は、日本産*A. catenella*, *A. tamarensis*, *A. affine*と*A. cohorticula*株に比較的高い反応性がみられるものの、*A. insuetum*やタイ産*A. tamarensis*株とはやや低い反応性を、*A. pseudogonyaulax*株にはほとんど反応性を示さなかった。M151-1やMT15-1 は、*A. pseudogonyaulax*を含む 6 種 7 株すべて同程度の反応性を示した。MT15-2は、タイ産*A. tamarensis*株にのみ高い反応性を示し、他 6 株には反応性を示さなかった。

## 3. *Alexandrium*属以外の種に対する各抗体の反応性

*Alexandrium*属以外の種として、同じ目に属する*Peridinium cunningtonii* PC6株や同じ綱に属する*Gymnodinium mikimotoi* G303-ax2株、*Cryptocodinium cohnii* ATCCe30021株さらにラフィド藻綱*Chattonella marina* NIES-118や

*Heterosigma akashiwo* NIES-5株と8抗体との反応性についてTable 16に示した。いずれの抗体も *Alexandrium*属以外の株には全く反応性を示さなかった。

Table 16. Reactivity of 7 monoclonal antibodies against various species by means of an indirect immunofluorescence method

Species	Reactivity						
	M8751-1	M22-1	M22-3	M151-1	M102-3	MT15-1	MT15-2
<i>A. catenella</i> TNX22	±	++	++	++	++	-	-
<i>A. tamarense</i> OFX151	+++	++	++	+++	++	++	-
<i>Peridinium cunningtonii</i> PC-6	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gymnodinium mikimotoi</i> G303-ax2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptothecodinium cohnii</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chattonella marina</i> NIES-118	-	-	-	-	-	-	-
<i>Heterosigma akashiwo</i> NIES-5	-	-	-	-	-	-	-

+++ positive cell ratio 80-100%; ++ 50-80%; + 30-50%; ± 10-30%; - 0%

#### 4. フローサイトメーターを用いた本藻の定量的検出の試み

間接蛍光抗体法により *Alexandrium*属藻類の生細胞を処理すると、その処理中に細胞がかなり破裂し、本藻を定量的に検出する際に問題になると思われた。よって、細胞の破裂を抑えるために、細胞を間接蛍光抗体法にて処理する前に、2%パラホルムアルデヒドによりその固定を行った。あらかじめ、直接計数およびフローサイトメーターにより計数した *A. tamarense* OFX151生細胞を、パラホルムアルデヒドにより固定しさらに間接蛍光抗体法により処理したのち、再び直接計数およびフローサイトメーターにより計数し、これらと固定前の計数値と比較した(Table 17)。その結果、まず直接計数とフローサイトメーターによる計数値は、固定前後いずれについてもほぼ同じであることが判明し、フローサイトメーターによる本藻の”読み過ごし”はほとんどないことが明らかとなった。また、固定前の計数値と、固定後さらに間接蛍光抗体法により処理したのちの細胞の計数値を比較した結果、後者は前者の約9割であったことから、本法により本藻を定量的に検出することが可能であることが示唆さ

れた。

Table 17. Evaluation of a counting technique using a flow cytometry and a loss of cells of *Alexandrium* which were treated by an indirect immunofluorescence method

	Before fixation		After labelling	
	Counting by microscopy	Counting by flow cytometry	Counting by microscopy	Counting by flow cytometry
Cell number	49824	50018	46999	46388
(Standard deviation)	(903.4) n=5	(719.7) n=3	(1607.5) n=5	(903.4) n=3

パラホルムアルデヒドを用いて固定した *A. catenella*と *A. tamarense*代表株に対する、抗体M8751-1の反応性を、間接蛍光抗体法によりフローサイトメーターを用いて解析した結果、本抗体は *A. catenella*株には弱い反応性（相対的反応性の平均値は191）を、 *A. tamarense*株には強い反応性（平均値569）を示すことが確認でき、本抗体を用いフローサイトメーターにより、両2種を明確に識別可能であった(Table 18)。

Table 18. Reactivity spectra of monoclonal antibody M8751-1 to various strains of *Alexandrium catenella* and *A. tamarense* by an indirect immunofluorescence method using a flow cytometry

Strain	Relative reactivity (SD*1)	
	Labeled cells	Control cells
<i>Alexandrium catenella</i>		
<i>A. catenella</i> TNX 4	217.6 (132.8)	29.6 (11.4)
<i>A. catenella</i> TNY11	147.0 (98.3)	27.9 (34.9)
<i>A. catenella</i> TNX12	165.4 (70.0)	20.8 (10.0)
<i>A. catenella</i> TNX22	328.5 (177.7)	27.0 (16.0)
<i>A. catenella</i> OFX072	90.1 (56.4)	20.9 (9.8)
<i>A. catenella</i> OFY101	187.7 (135.0)	26.0 (12.8)
<i>A. tamarense</i> OFY045	425.4 (137.3)	53.7 (26.8)
<i>A. tamarense</i> OFX151	365.9 (120.9)	31.9 (21.5)
<i>A. tamarense</i> OFX191	556.4 (176.0)	54.9 (24.6)
<i>A. tamarense</i> OFY192	703.4 (176.6)	99.7 (29.4)
<i>A. tamarense</i> AT631	736.6 (203.2)	51.9 (21.6)
<i>A. tamarense</i> FK-7B8	626.9 (162.1)	101.1 (31.1)

\*1 n=1000



間接蛍光抗体法により、蛍光顕微鏡下で各抗体の各株に対する反応性を観察した際、各株間において細胞表面の蛍光環の強さがかなり異なる場合がしばしば見られた。このような場合、この差はその抗体が認識する抗原分子が、細胞表面に“密”あるいは“疎”に分布していることを反映している、あるいはその抗体の抗原分子への親和性が異なることを反映しているものと考えられる。ところで、このような蛍光環の強さを蛍光顕微鏡を用いて判定する場合、観察者によりその判定が異なる場合も十分考えられ、数値的に相対評価することが困難であるため、本研究においてはその反応性を陽性細胞の比率を用いて判定をした。その蛍光環の蛍光強度の相対値を得るために、フローサイトメトリーを応用することによりその数値化が可能となった。

抗体M8751-1およびM102-2により、日本産*A. tamarense*と*A. catenella*の各株は免疫学的に明確に識別可能であった。この結果は、Sakoら(1990)によるアインザイム集団解析や交配実験の結果と一致するものであり、前章における5.8S rDNAとITS領域より得られた分子系統樹にも一致するものであった。これらの結果は、両種を別種とした形態学的分類を支持した。また、抗体M8751-1はアメリカ産*A. catenella*, *A. tamarense*そして*A. fundyense*の各株にも強い反応性を示し、これら3種の株は免疫学的に日本産*A. tamarense*と同じグループにはいることが明らかとなり、この結果は前章の系統樹の結果と矛盾しないものであった。Scholin and Anderson (1993)も、28S rDNAを用いて得られた系統樹の中でこれらの株と日本産*A. tamarense*は同じブランチを形成することを明らかにしている。これらの事実を総合すると、Balech(1985)の形態学的分類基準に従って同定されたアメリカ産の*A. catenella*株、*A. tamarense*株と*A. fundyense*株は、日本産*A. tamarense*と同種である可能性が高いと考えられる。今後、これらアメリカ産3種についての形態分類の基準を見直す必要があることが強く示唆された。

また、抗体M8751-1, MT15-2やMT15-4を用いて、免疫学的にタイ産*A. tamarense*と日本産*A. tamarense*とを識別できた。これに関連して、Kodamaら(1987)はタイ湾における形態学的に*A. tamarense*と分類されている株の毒成分の検討を行っており、日本産*A. tamarense*はそのほとんどが有毒株であるが、タイ湾の異なる2地点より分離した4株はいずれも無毒であることを明らかにしている。日本産とタイ産の*A. tamarense*の全タンパク質の電気泳動パターンを比較した結果も、日本産株とタイ産株間に明らかな差異を示しており、以上のことからこのグルーピングは強く支持される。これらの事実、前章のITS領域を

用いた分子分類の結果と一致するものであり、両2グループは別の分類群に属する可能性が高いと思われる。よって、*A. tamarense*は形態学的には非常に似ているが分子生物学的に異なったグループからなることが示された。

和歌山県串本産*A. tamarense* WKS-1株について、抗体M8751-1は間接蛍光抗体法により反応性を示したが、ELISA法では反応性を示さなかった。その原因として、WKS-1株と他の*A. tamarense*株は同一ではないが非常によく似た抗原決定基を持っている、あるいは抗原決定基は同一であるがそれ以外の抗原分子が互いに異なった構造を持っており、その結果として抗原決定基がマスクされたあるいは抗原の固相への吸着が妨げられたことなどが考えられる。今回免疫学的手法を用いて*A. tamarense* WKS-1株と他の*A. tamarense*株とを“明確に”識別することはできなかった。前章のITS領域を用いた“分子分類”の結果、両者は系統的に近縁ではあるが、明確に識別することが可能であった。よって、得られた各抗体による免疫学的グルーピングに比べて、ITSの塩基配列の比較による分子生物学的識別の方が、その“感度”が高い可能性が示唆された。

抗体M8751-1は間接蛍光抗体法を用いたフローサイトメーターによる解析、およびELISA法による解析のいずれによっても、形態学的に日本産の*A. tamarense*と分類された株に対して非常に高い反応性を示した。この一方で、形態学的に*A. catenella*と分類されている株にも弱いながらも反応性を示した。この結果は、*A. catenella*の細胞表面にM8751-1に対して親和性の低い抗原分子が分布しており、*A. tamarense*の表面にはより親和性の高いいわば“種特異性の高い抗原分子”が分布しているのか、あるいはErdleyら(1990)が大型海藻*Macrocystis*属に対するモノクローナル抗体の反応性について論じているように、両種間において同一の抗原分子が分布しておりその反応性の差はその細胞表面の量的なものを反映しているのかについては、さらなる解析を必要とするところである。

*A. affine*は、我が国においては北海道サロマ湖や青森県陸奥湾あるいは瀬戸内海でその発生が報告されているが(Fukuyo et al., 1985)、産業的に重大な被害を今までのところもたらしていない。しかしながら、サロマ湖ではその赤潮の発生が報告されており(清川・菊池, 1975)、今後ともその発生状況の正確な把握が求められている種である。今回得られた抗体のうち、M8751-1は*A. affine*に反応性を示さなかったが、*A. catenella*と*A. tamarense*の共通抗原を認識するM22-1, M22-3とM102-3, タイ産*A. tamarense*より得られたMT15-1とMT15-4は*A. affine*と高い反応性を示した。このことは、*A. affine*の細胞表面には、*A. catenella*と*A. tamarense*の各株との共通抗原の存在が示され、免疫学的にこれらの種が近似種である可能性が示唆された。また、この結果は前章の分子分類の結果により裏

付けることができた。

*A. cohorticula*は、メキシコ湾においてその発生が報告されて以来(Balech, 1967)、タイ湾(Fukuyo, 1988)と日本の相模湾(緒方ら, 1989)でその存在が報告されている。本種はゴニオトキシン等の神経毒を持つため(Kodama et al., 1988)、最近魚介類の毒化との関連について注目されている。今回得られた抗体と、タイ産2株に対する反応性と日本産1株に対する反応性は、タイと日本という地域性を越えて、いずれの抗体においてもほぼ一致していた。また、タイ産*A. tamarense*より得られた抗体MT15-1とMT15-4が本藻に50-80%と高い反応性を示したのは、本2種間の類縁関係を系統発生的に考える上でも興味をもたれるところである。なお、本種についてはrDNAの分子分類を行っていないので、*Alexandrium*属内での系統的な位置関係については言及できない。

*A. insuetum*は、韓国において最初にその発生が報告され(Balech, 1985)、その後1990年に瀬戸内海においてその発生が報告されている(Yuki et al., 1990)。本種は形態学的に*A. pseudogonyaulax*に非常に類似しており、その正確な同定は非常に困難をとまなっている。抗体M22-1, M151-1やMT15-1等は*A. insuetum*に対して高い反応性を示すが、これらの抗体の*A. pseudogonyaulax*に対する反応性とは異なっていた。この2種間の細胞表面は免疫学的に大きく異なることが示唆される。また、*A. insuetum*に対して間接蛍光抗体法を用いた際には、しばしば非特異的な反応性がみられた。この原因としては、大型海藻*Macrocystis*の精細胞へのモノクローナル抗体の反応にみられたように(Eardley et al., 1990)、*A. insuetum*藻体はその細胞の表面に粘液質に富む多糖様物質を分泌することによって引き起こされていることが考えられる。このような非特異的な結合を抑えるために、本種に対し間接蛍光抗体法を行う際には、Eardlyらの方法に従って1%のBSAを含むPBSを用いてマスキングを行ってから1次抗体を加え反応させた。

今回作製したいずれの抗体も間接蛍光抗体法により日本産の*A. pseudogonyaulax*とは反応性を示さなかった。*A. pseudogonyaulax*は、1983年Horiguchiらにより*Goniodoma pseudogonyaulax* Biechelerと形態分類学的に同定されたが、その後Yukiらは本種を*Alexandrium*に移し*A. pseudogonyaulax*と分類することを提唱している(1992)。今回、用いた抗体全てが反応性を示さなかったことにより、本株は*Alexandrium*属の他種とは免疫学的に異なる細胞表面を有している可能性が強く示唆された。

*Alexandrium*属以外の種と各抗体を反応させたところ、他目や他綱の5種とは全く反応性を示さなかった。よって、少なくとも他属5種には本実験に用いた*Alexandrium*属との共通抗原が存在しないことが明らかになった。また、抗体

MT15-1が*A. pseudogonyaulax*以外の用いた*Alexandrium*属5種全ての株と反応しているのをはじめとして、得られた抗体は*Alexandrium*属に高い特異性を示し、少なくとも免疫学的に反応性が認められた数種間には共通抗原が存在することが示された。よってこれらの抗体が、*Alexandrium*属の識別に重要な役割を果たすことが期待される。今後は、さらにこれらの抗体の本属他種株への反応性を解析することが望まれる。

種特異性の高い抗体M8751-1, M102-2そしてMT15-2は、*Alexandrium*藻体を30%エタノールにより解毒したのち、生体免疫法を用いることにより得られた。それに対し共通抗原を認識する抗体M22-1, M22-2, M22-3, M102-3とM151-1は、藻体に120℃・1時間という強い熱処理を行った抗原を免疫することにより得られた。これらの抗体は*A. catenella*と*A. tamarense*いずれの株にも反応性を示し、この結果により両種の細胞表面には共通抗原が存在する可能性が示された。これらの抗体がいずれも種特異性を示さなかった理由として、抗原に対する過激な熱処理のため、熱に弱いなんらかの細胞表面構造が破壊されてしまい、熱処理により安定性の高い、両種に普遍的にみられる糖のような外殻殻板の基本骨格を構成する分子に対する抗体が多く得られたことも考えられる。

また、抗体M22-1を除いて他の共通抗原を認識する6抗体はいずれも体外免疫法により得られた。これらの抗体はいずれも種特異性が低かった。一般的に体外免疫法により得られる抗体にはクラスIgM抗体が多く、その特異性はあまり高くないとされているが、現時点ではその原因は不明である。他の研究においてはときには特異性の高いものも見られ、これらの体外免疫法で得られたIgMクラスの抗体の特異性については未だに議論の分かれるところである。体外免疫法により、カルモジュリン(Robert et al., 1983)やRNAポリメラーゼ(Dahmus et al., 1988)に対する特異性の高い抗体の作製も報告されているものの、その一方で特異性が低い抗体が得られるケースも見られている(Erdley et al., 1990)。特異性の低い点を改善し、特異性の高いIgG抗体の得られる効率を高めるため、Boerら(1988)は生体免疫と体外免疫の組合せ法を採用した。本研究において、タイ産*A. tamarense*について本法を試みたところ、得られた抗体MT15-1はクラスIgMでありその特異性は低いものであった。その一方で、生体免疫法により得られた2抗体MT15-2とMT15-4はクラスIgMであったが高い特異性を示し、日本産*A. tamarense*に特異性の高い抗体M8751-1もそのクラスはIgG<sub>1</sub>であったが、いずれも生体免疫法により得られたものであった。しかし、生体免疫法によっても特異性が低い抗体が得られる場合もしばしば見られ(Jones et al., 1988)、今後検討が必要である。

以上の結果により、得られた抗体を用いて本藻を免疫学的にグルーピングす



ることが可能で、このグルーピングは分子分類の結果とほぼ一致することが明らかとなった。よって次節では、これらの抗体を実際の現場試料中に含まれる本藻へ応用が可能か否かについて検討を行った。

### 第 3 節 抗体の現場試料への応用

#### 材 料 および 方 法

##### 1、増殖段階の異なる細胞の調製

*A. tamarense* OK875-1株を SWII m 培地で 15℃ (2,000 lux) で培養し、3, 6, 10, 13, 16, 20, 25 日目にそれぞれ細胞を採取し、得られた抗体を用いて第 3 章第 2 節に示したドットイムノアッセイ法あるいは間接蛍光抗体法によりフローサイトメーターを用いることによって増殖段階の異なる細胞に対する反応性を判定した。

##### 2、有性生殖の各段階の細胞の調製

*A. catenella* TNY7 と TNX22 をそれぞれ SWII m 培地において標準培養条件下で培養し、対数増殖期の細胞を集藻し、96 穴平底マイクロプレートの各ホールにそれぞれ約 1,000 細胞加えて混合し、培養を行った。混合後、倒立顕微鏡下で運動性接合子 (planozygote) を確認し、さらに培養を行うことにより休眠性接合子 (cyst) を得た。さらに、休眠接合子を低温 (4℃) に 1 カ月放置した後、15℃ にて培養することによって発芽した F<sub>1</sub> 細胞を 1 細胞取り上げ、SWII m 培地で培養し TT722-3 株とした。これら有性生殖各段階における細胞への各抗体の反応性については、間接蛍光抗体法により蛍光顕微鏡を用いその解析を行った。

##### 3、各種培養条件下の細胞の調製

*A. tamarense* を滅菌海水にて培養した細胞、あるいは培養照度を現場レベル近くまで落としたと思われる 800 lux にて培養した細胞をそれぞれ調製した。これらの細胞に対する抗体 M8751-1 の反応性を、間接蛍光抗体法を用いてフローサイトメーターにより分析した。

#### 4、*Alexandrium* 属を含む現場海水試料の調製

以下に示す本属藻類を含む現場海水試料を、20  $\mu$ m メッシュのナイロンネットを用いて濃縮し、各抗体を用いて前述の間接蛍光抗体法により処理した後、蛍光顕微鏡によりその反応性について解析した。

1、1990 年と 1991 年 5 月に、和歌山県水産試験場の竹内照文氏により和歌山県田辺湾より採取され、同氏に分譲していただいた現場海水試料。

2、1991 年 6 月に、岩手県大船渡湾より岩手県水産試験場の菊池達也氏により採取され、同氏により分譲していただいた現場海水試料。

3、1991 年 7 月に、長崎県橘湾より長崎県水産試験場の轟重敏氏らにより採取され、同氏により分譲していただいた現場海水試料。

4、1992 年 5 月に、山口峰生氏らにより広島湾より採取され、同氏に分譲していただいた現場海水試料。

#### 結 果

##### 1. *Alexandrium* 属藻類の各増殖段階および有性生殖の各段階における各抗体の反応性

*A. tamarense* OK875-1 株の栄養増殖各段階における各抗体の反応性について、ドットイムノアッセイ法により解析した。そのうち、M8751-1 の結果について Fig. 24 に示した。本抗体の本株の増殖各段階の藻体に対する反応性にはほとんど変化がないことが、ドットイムノアッセイ法により示された。他 3 抗体 (M22-1, M22-3 と M151-1) についても同様であった。また、抗体 M8751-1 を用いて *A. tamarense* OFX151 株の栄養増殖各段階の細胞に対する反応性を、間接蛍光抗体法によりフローサイトメーターを用いて解析した結果、その反応性は安定していることが再確認できた。

また、*A. catenella* TNY7 と TNX22 の有性生殖の各段階における 4 抗体の反応性について間接蛍光抗体法により蛍光顕微鏡にて解析した結果を Table 19 に示した。用いた 4 抗体はいずれも親株とその F<sub>1</sub> 株 (TT722-3) の栄養細胞には反応性を示すが、運動性接合子と休眠接合子 (シスト) については抗体 M151-1 を除いてまったく反応性を示さなかった。M151-1 については運動性接合子と休眠接合子双方に 10-30% と低い比率でしかも薄い蛍光環であるが反応性を示した。また、*A. tamarense* に特異的な抗体 M8751-1 については、*A. tamarense* の休眠子が得



られなかったためその解析が行えなかった。なお、有性生殖の過程は、一般に栄養細胞が配偶子に変化して接合が生じる。本属藻類では配偶子の存在は現在まで確認されていないものの、培養株においてその接合形成率は低いことから、配偶子の形成率も低いことが考えられる。もし、本属藻類においても配偶子の存在が確認されれば、各抗体の配偶子に対する反応性を解析する必要がある。

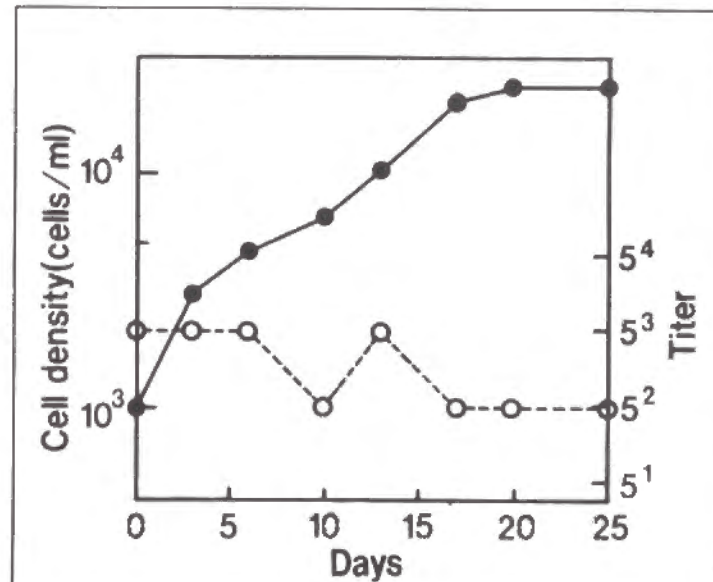


Fig. 24 Growth curve of *A. tamarensis* OK875-1 and relative reactivity of monoclonal antibody M8751-1 against cells of OK875-1 in various growth phases.  
●, cell density; ○, reactivity (titer) of antibody M8751-1 to strain OK875-1 determined by a dot immunoassay.

Table 19. Reactivity of vegetative cells(*A. catenella* TNY7), planozygotes, cysts(TNY7/TNX22) of *A. catenella*, and F<sub>1</sub> cells(TT722-3) with four monoclonal antibodies by means of an indirect immunofluorescence(IIF) method

	Reactivity			
	M22-1	M22-3	M151-1	M102-3
Vegetative cells	+++	++	+++	++
Planozygotes	-	-	±	-
Cysts	-	-	±	-
F <sub>1</sub> vegetative cells	+++	++	++	++

+++ positive cell ratio 80-100%; ++ 50-80%; + 30-50%; ± 10-30%; - 0%

## 2. 各種培養条件下における抗体の反応性について

実際の現場試料にできるだけ近い条件で増殖させた細胞に対する、これらの抗体の反応性を解析することを目的として、まず細胞を滅菌海水で培養し、これらの細胞に対する抗体の反応性を間接蛍光抗体法を用いてフローサイトメーターにより解析した。その結果、その反応性はSWIIm培地を用いて培養した細胞のそれとほとんど変わらないことが明らかとなった(Fig. 25)。さらに、照度を2段階に変化させて培養を行いそれぞれの細胞に対する反応性をフローサイトメーターを用いて解析した結果、両者においてほとんどその反応性に差がないことも明らかとなった(Fig. 26)。

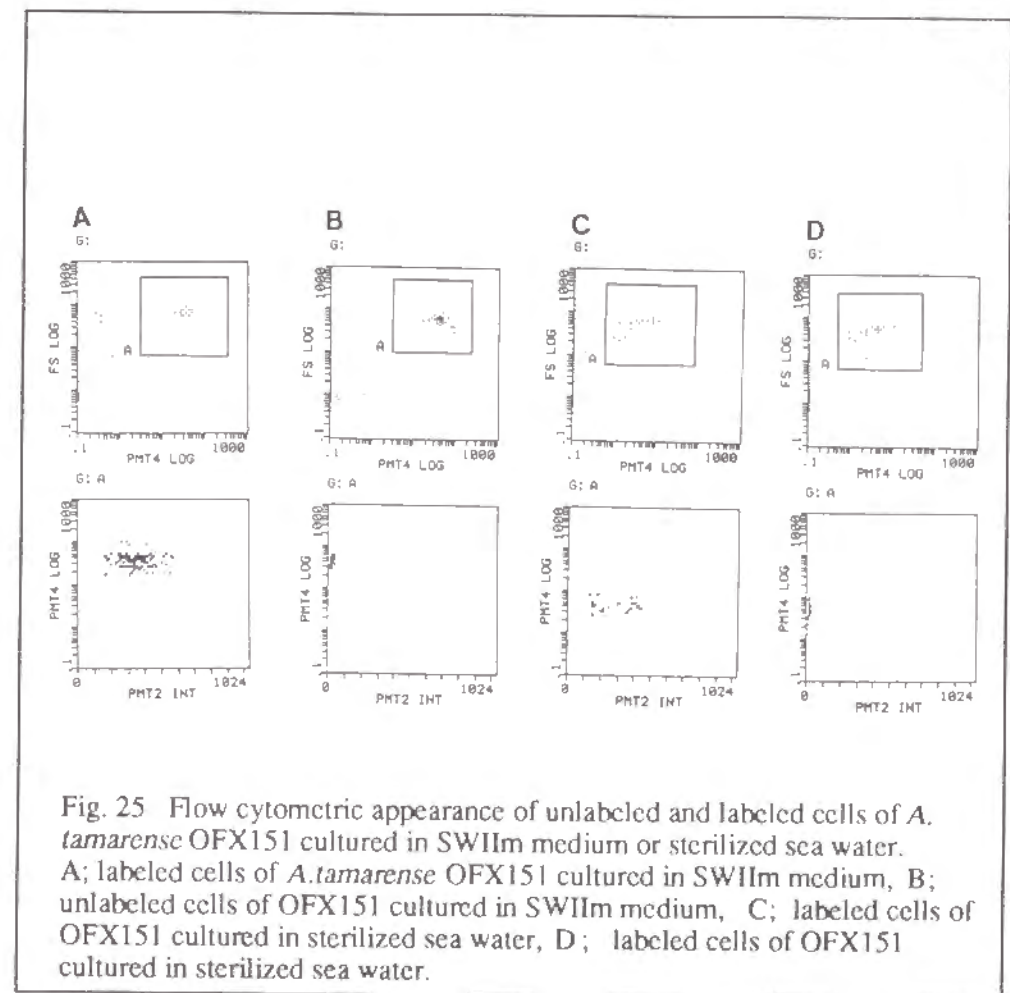
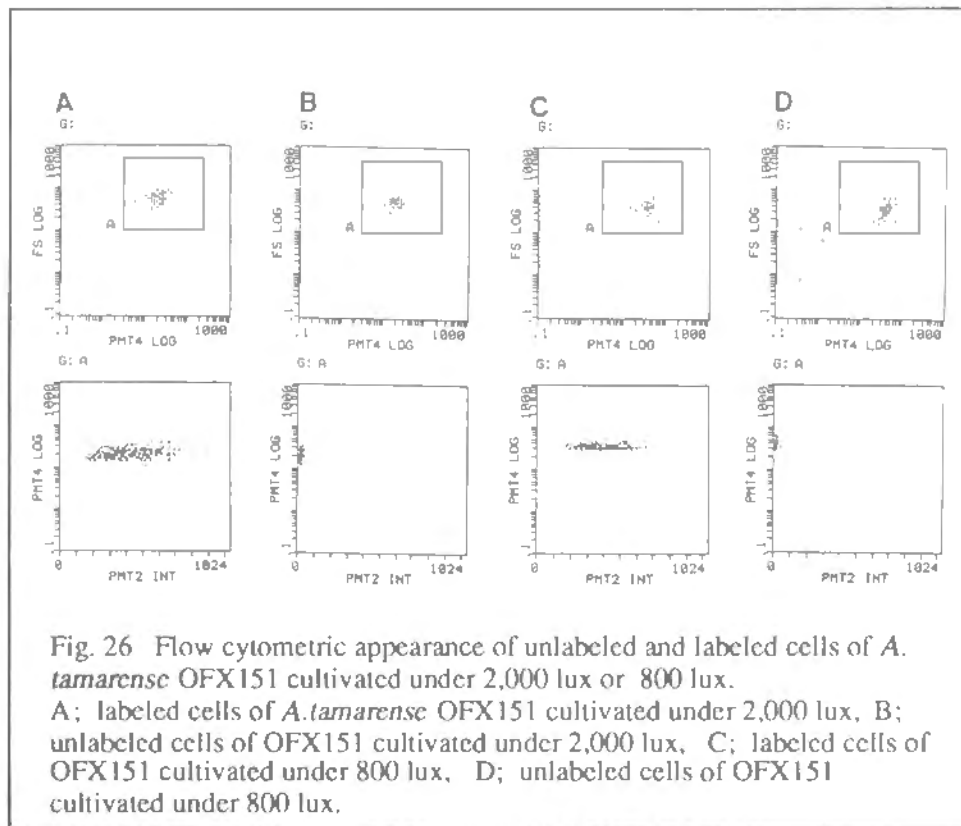


Fig. 25 Flow cytometric appearance of unlabeled and labeled cells of *A. tamarensis* OFX151 cultured in SWIIm medium or sterilized sea water. A; labeled cells of *A. tamarensis* OFX151 cultured in SWIIm medium, B; unlabeled cells of OFX151 cultured in SWIIm medium, C; labeled cells of OFX151 cultured in sterilized sea water, D; labeled cells of OFX151 cultured in sterilized sea water.



### 3. 現場試料への各抗体の反応性

1990年と1991年5月和歌山県田辺湾、1991年6月の岩手県大船渡湾、1991年7月の長崎県橘湾そして1992年5月の広島県広島湾の現場濃縮海水をナイロンネット(20 $\mu$ m)を用いて再濃縮後、これに含まれる*Alexandrium*属藻類に対する各抗体の反応性を、間接蛍光抗体法を用いて蛍光顕微鏡により解析した結果をTable20に示した。これら4試料と各抗体との反応スペクトルを、*Alexandrium*属の培養株のそれと比較したところ、これらの試料はそれぞれ培養株の*A. catenella*, *A. tamarensis*, *A. affine*そして*A. catenella*の反応スペクトルを示すことが明らかとなった。この結果により、これらの試料には本3種がそれぞれ含まれていた可能性が示唆された。そこでこの結果を確認するために、これらの現場試料より本属藻類と思われる細胞をそれぞれ数クローンずつ分離し、これを培養後再び各抗体との反応交差性を解析した。その結果、田辺湾、大船渡湾そして橘湾の試料は、前述の3種とそれぞれ一致するスペクトルを示した。またこれらの分離株と、すでに形態的に種の同定がされている培養株よりその全ク

ンパクを抽出し、SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行いこれらと比較した結果、田辺湾、大船渡湾および橘湾の試料より単離した株は、それぞれ*A. catenella*, *A. tamarensis*そして*A. affine*であることが確認できた。しかしながら広島湾の現場試料は抗体M8751-1と反応性が弱く*A. catenella*を含んでいると推定されたが、南西海区水産研究所の山口峰生氏らにより同時期に広島湾より分離された株(HIAIとHI38株)への本抗体の反応性は高く、培養株の*A. tamarensis*のスペクトルとほぼ同じものであった。また、これら2分離株の前章におけるrDNAの分子分類の結果(Fig. 7)も、これらの分離株が*A. tamarensis*であることを支持するものであった。

Table 20. Reactivity of 9 monoclonal antibodies against field samples of *Alexandrium* collected in different bays

Sample	Reactivity								
	M8751-1	M22-1	M22-2	M22-3	M102-3	M151-1	MT15-1	MT15-2	MT15-4
Culture									
<i>A. catenella</i>	±	++	++	++	++	++	+++	-	-
TNY7									
<i>A. tamarensis</i>	+++	++	++	++	++	+++	++	-	-
OFX151									
<i>A. affine</i>	-	++	N.D.	++	++	±	++	-	++
Field samples									
Tanabe Bay, May 1990, 1991	-	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-
Ofunato Bay, June, 1991	+++	++	N.D.	±	++	++	+++	-	-
Tachibana Bay, July, 1991	-	++	N.D.	++	+	±	+++	-	+++
Hiroshima Bay, May, 1992	±	++	++	++	++	++	++	-	-

+++ positive cell ratio 80-100%; ++ 50-80%; + 30-50%; ± 10-30%; - 0%; N.D. not done

### 考 察

得られた各抗体に対する、*Alexandrium*属各種の反応性の解析には、培養株の確立を必要とせず、現場レベルで究極的には1細胞のみを用いてもその反応性を判定しうる、間接蛍光抗体法を主に用いた。

本研究で、得られた抗体の本藻の増殖各段階の細胞に対する反応性、滅菌海水にて培養した細胞に対する反応性、そして培養照度を変化させた細胞に対する反応性が、いずれも安定していたことから、これらの抗体は藻体の生育環境



にはほとんど関係ないものと推定し、少なくとも栄養細胞に関してはこれらの抗体の現場試料への応用が可能であると判定した。また、栄養細胞以外の細胞すなわち、有性生殖各段階の細胞への反応性を解析した結果、各抗体は栄養細胞には反応を示すが、接合によって生じた運動性接合子や休眠接合子にはほとんど反応性を示さず、F<sub>1</sub>株の栄養細胞には反応性を示した。この結果により、これらの抗体を現場試料に応用する際に、その試料中に多くの運動性接合子が含まれている場合には、これらを検出できない可能性があり、このような試料を解析する際に十分に留意する必要がある。

これらの抗体が接合子に反応しない理由として、栄養細胞の時点では外殻鎧板には存在していたこれらの抗体により認識される抗原分子が、有性生殖の過程で失われた、あるいはその接合子形成に伴って分泌された多糖様物質でその抗原決定基が“マスク”されたのかいずれかが考えられる。Griefら(1987)は、*Chlamydomonas reinhardtii*の栄養細胞と接合子の細胞壁の化学的な成分比較と、免疫学的手法による接合子の細胞壁の構造についての解析を行っているが、これによるとこの2つの段階において細胞壁のタンパク質や多糖について、その組成が大きく異なっているとしている。*Alexandrium*属においても、Doucetteら(1989)は電子顕微鏡のレベルで栄養細胞と休眠接合子の膜構造が異なることを報告している。各接合過程において、細胞表層の構造や成分組成が大きく変化することにより、栄養細胞に存在していた抗原分子が失われた、あるいは新たな表層構造が生成された可能性も考えられる。

日本沿岸3地点より採取した現場海水中に含まれる*Alexandrium*属藻体試料に対する各抗体の反応スペクトルを、蛍光顕微鏡を用いて解析することにより、それらの試料中に含まれる種の同定が可能であることが示された(Adachi et al., 1993c)。培養株についてはフローサイトメーターを用いて、間接蛍光抗体法により処理した細胞を定性的かつ定量的に解析できる見通しが明らかとなったことにより、得られた各抗体を用いて簡便かつ迅速に、多量の現場海水試料を解析しうる可能性が示唆された。しかしこれらの抗体は、表現型である抗原分子を認識するため、これを“tag”として用いることにより現場試料中の本藻を検出するためには、現場海水中の“いかなる増殖条件下の栄養細胞”とも、これらの抗体が安定して反応するかどうかを、今後より多くの現場試料について解析する必要があると思われる。実際に1992年5月の広島湾の現場試料については、抗体M8751-1の反応性が低かったために、当初は免疫学的に*A. catenella*と同定した。しかし同時期に広島湾より分離された単離株(2株)は、M8751-1と強く反応し、さらにそのrDNAを解析した結果、これらの株は*A. tamarense*であることが判明した。この反応性の違いが生じた原因として、次の2つのことが考

えられる。1) 広島湾の現場試料は、*A. catenella*が優占していたが*A. tamarense*細胞も含んでいた。あるいは、2) 現場試料には*A. tamarense*が含まれていたが、その環境のもとで増殖した*A. tamarense*細胞への抗体M8751-1の反応性は低かった。もし、後者であるならば、これらの抗体の現場試料への反応性を再検討する必要がある。現在までに、培養株における無性生殖各段階の細胞、滅菌海水にて培養した細胞、明暗条件を変化させて培養した細胞への反応性について解析が行われているにすぎず、今後水温や栄養状態等について、より現場に近い条件で本藻の培養を行うことによって、様々な条件下で生育した細胞に対する各抗体の反応性をより詳細に解析する必要がある。

今回得られたモノクローナル抗体は、前述したように本藻の細胞表層に反応し、その蛍光強度が強いため、フローサイトメーターを用いた現場試料への応用が比較的容易と考えられるが、これらの抗体により認識される抗原決定基が、表現型の1つであるために外的な条件により影響を受ける可能性を内在している。従って、モノクローナル抗体の利用と平行して、前章で述べたrDNAの特徴のある部分(ITSの特定領域など)より設計したプローブを用いることにより、現場試料のより正確な種間・種内の識別・定量化が可能になるものと期待される。

#### 第 4 節 摘 要

(1) *Alexandrium*属の細胞表層の外殻鎧板に反応する10種のモノクローナル抗体を調製した。

(2) 得られた抗体の本属培養各株への反応性を解析することにより、*Alexandrium*属各種のグルーピングを行った。これらの免疫学的手法による本藻のグルーピングの結果は、前章で述べたrDNAの塩基配列の比較による“分子分類”の結果とほぼ一致することが明らかとなった。

(3) 実際の現場海水試料中に含まれる*Alexandrium*属の種の識別・同定にこれらの抗体を応用したところ、その応用が可能であることが示唆された。しかし研究室において培養条件下で増殖した細胞と、実際の現場海水中の細胞間において、各抗体の反応性の強度が若干異なる可能性も明らかとなり、今後は本藻の培養条件を現場の条件にできるだけ近づけた上で、各抗体の反応性を解析する必要があると思われる。



*Alexandrium*属藻類中でも *A. catenella*, *A. fundyense* および *A. tamarense* は、ゴニオトキシンやサキシトキシンといった強力な神経毒を有し、世界各地において麻痺性貝毒を引き起こしている。これらの藻類は、現場海水 1 L あたり 100 細胞の発生であっても二枚貝を毒化させ、その出荷停止をしばしば引き起こすため、水産業にとって大きな被害を及ぼしている。これらの被害を予防あるいは軽減するためには、これらの藻類の発生初期段階で、正確かつ迅速に本藻を識別し、その計数を行いその存在を追跡することが極めて重要である。現在本藻の分類は、その形態学的特徴にのみ基づいて行われている。しかし、本属藻類は形態的に酷似している上に、このような形態分類は形態学的特徴が表現型の 1 つであるため環境条件により変化しやすいこと、この分類群の分類体系が未だ確立していない現状であり分類学者により注目する形質が異なること等の問題点を持っている。従って、環境条件に左右されないより正確かつ簡便で定量性を兼ね備えた本藻の識別・同定法の確立が強く望まれている。

そこで著者は、以上のような形態分類の問題点を解決すべく、環境条件等により影響を受けないと考えられる遺伝子型として rDNA に注目した。なかでも、18S や 28S rDNA よりもその分岐度が高いと考えられる転写される内部スパーサー (ITS) と 5.8S rDNA 領域の塩基配列を本属数種について明らかにし、これを比較することによりその分子分類を行った。さらに分子同定法の確立をめざして、ITS と 5.8S rDNA 領域より種特異的 DNA プローブの作製を試み、培養株に対してその反応性の解析を試みた。また、実際の現場レベルでの応用が比較的容易と考えられる、本属藻類に特異的に反応するモノクローナル抗体の作製を試み、その際得られた各抗体の本属各株への反応性を解析することにより本属藻類のグルーピングを行った。表現型としてのこれら免疫学的なグルーピングと、遺伝子型としての DNA 塩基配列の比較により得られた分子分類の結果を比較した上で、これらの抗体の実際の現場海水試料中に含まれる藻体への反応性を解析した。得られた成果の概要を以下に示す。

(1) *Alexandrium* 属藻類より、その全 DNA を抽出・精製する方法を確立した。これを鋳型として用い PCR 法により、本属 7 種 30 株について ITS および 5.8S rDNA 領域を含む DNA 断片の増幅に成功した。これらを数種の制限酵素を用いて消化したところ、本属種間・種内において制限酵素切断片長多型 (RFLP) が検出でき、本 ITS 領域は本属藻類の分子分類を行うに際し、その“分子マーカー”となり得る可能性が示された。

(2) 本属 6 種 24 株の ITS 領域の DNA 断片の塩基配列を決定し、各株についてこれらを比較しその系統樹を作製した結果、これらの株を ITS 領域を用いて 7 つのグループに分けることが可能で、これらの株の系統的相互関係を明らかにすることができた。中でも、アメリカ産および日本各地 6 地点より分離された *A. tamarense* とアメリカ産 *A. fundyense* 株が同じブランチに入ることがわかった。しかし、和歌山県串本産ならびにタイ産 *A. tamarense* CU-15 株は、系統樹の中で前述のグループとは異なるそれぞれ別のブランチを形成することが明らかとなった。また、タイ産で *A. tamarense* と同定されている CU-1 株は *A. affine* と同じブランチを形成した。他株の ITS タイプについては、形態分類による形態種と一致していた。

(3) 得られた各株の塩基配列を比較した結果、ITS1 の 3' 末端の塩基配列 (149-177bp) が各 ITS タイプ内ではその相同性が高かったが、その反面、各タイプ間では著しく分岐的であることが明らかとなった。そこで本領域より *A. tamarense* と *A. catenella* にそれぞれ特異的と考えられる蛍光 DNA プローブを作製し、これらを *in situ* ハイブリダイゼーション法により培養株へ応用したところ、それぞれ種特異的な反応性を示すことが明らかとなった。

(4) *Alexandrium* 属の細胞表層の外殻錠板に反応する 10 種のモノクローナル抗体を調製した。

(5) 得られた各抗体の本属の培養各株への反応性を解析することによりそのグルーピングを行った。これらの免疫学的手法による本属藻類のグルーピングの結果は、rDNA の塩基配列の比較による“分子分類”の結果とほぼ一致することが明らかとなった。

(6) 実際の現場海水試料中に含まれる本属藻類の識別・同定にこれらの抗体を応用したところ、その応用が可能であることが判明した。しかし培養された本属藻類の細胞と実際の現場海水中の細胞間において、各抗体の反応性の強度が若干異なる可能性も明らかとなり、今後は本属藻類の培養条件を現場での条件にできるだけ近づけた上で、各抗体の反応性を解析する必要があると思われる。

以上の得られた結果により、本属藻類の ITS および 5.8S rDNA 領域を解析することによりその分子分類が可能となり、モノクローナル抗体による簡易識別の結果を裏付けることができた。そこで、分子分類に免疫学的グルーピングの結果もあわせて、本研究にて用いた本藻の各タイプ株の世界的な分布図を作製した (Fig. 27)。これにより得られた“分子種”のいくつかは形態分類による“形態種”に一致しなかった。しかし、このような分子分類は、モノクローナル

抗体を用いた免疫学的手法やアイソザイム等を用いた生化学的手法によるグルーピングとも一致し、形態分類にのみ基づいたこれらの藻類の種の同定を見直す必要があると思われる。とりわけ本研究で用いたrDNAのスペーサー部位は、遺伝子コード領域に働く強い純化淘汰をほとんど受けないと考えられ、交配可能な集団間においては生殖の過程で不等交差が起こりその領域は一様化される一方で、いったん生殖隔離により種分化が起こり、個々の集団が独立に進化するとき、個々の集団内に変異が蓄積されその集団間で分岐的な配列を持つようになることが予想できる。事実、本研究において、ITS領域は”種内”では極めて保存的であったが、種間においてはかなり分岐していた。この結果により、本研究で得られた分子種は、”生物種”を反映している可能性があると思われる。今後、本属藻類の分類を行うに際し、従来の形態分類に加えてDNAの塩基配列の比較等を用いた分子生物学的手法やアイソザイム分析等を用いた生化学的手法、交配実験による生物学的手法により総合的に種の実体を明らかにする必要があると思われる。

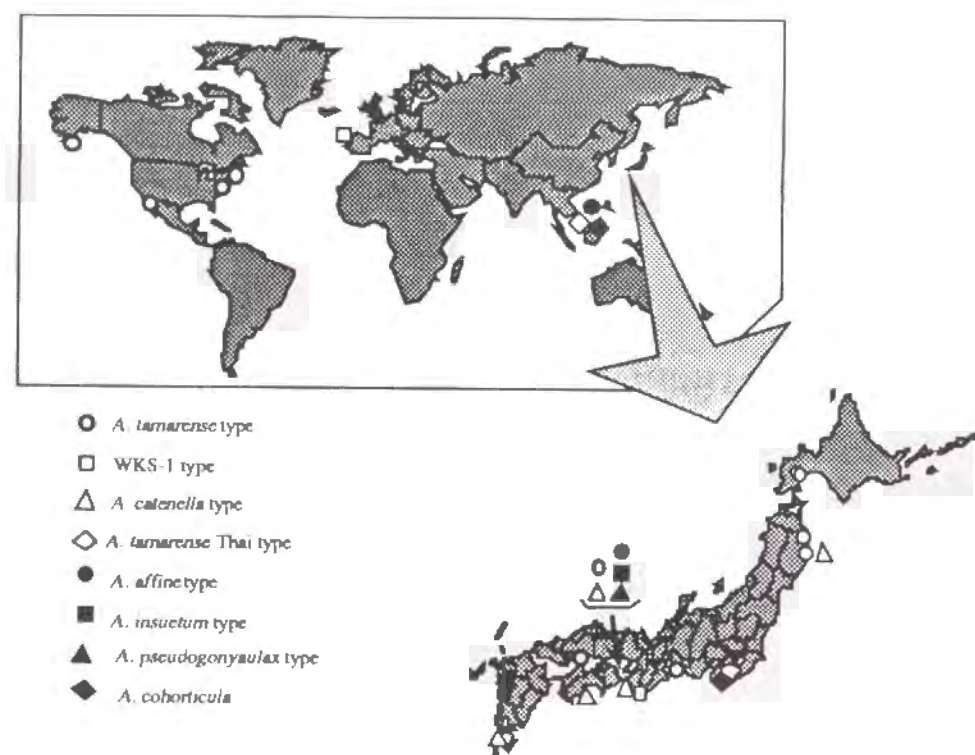


Fig. 27 Distribution map of *Alexandrium* species studied in this paper.

反応し、その蛍光強度が強いため、抗体を現場試料へ応用し、フローサイトメーターを用いてこれらの定量を行うことが比較的容易であると考えられる。しかしこれらの抗体は、表現型である抗原決定基を認識するためその反応性が環境条件により影響を受けるかもしれないという問題点を持っている。これに対し、DNAプローブはその蛍光強度が弱いこと、細胞内の核DNAにハイブリダイズするためにプローブを細胞膜へ透過させる必要があること等の問題点を有しているが、環境条件等によりその蛍光強度は影響を受けないと考えられる。そして、いったんその塩基配列を明らかにすれば世界中誰でもそのDNAプローブの作製が可能であるという利点も持っている。今後蛍光強度の増強等の技術的な問題が解決できれば、これらのDNAプローブは非常に有用な本属藻類の識別マーカーとなり得ると思われる。今後、抗体とDNAプローブ双方を”tag”として用いることにより多数の現場試料へその応用を試み、フローサイトメーターを用いてデータを解析することにより、現場海域における本属藻類の出現をその早期に正確、迅速かつ定量的に検出し、これにより麻痺性貝毒発生のモニタリングシステムが確立されることを期待したい。

第2章および第3章において、蛍光DNAプローブおよびモノクローナル抗体の培養株への反応性を解析し、双方とも培養株のタイピングに応用可能であることを明らかにした。このうちモノクローナル抗体は本属藻類の細胞表層に



## Summary and Conclusions

Toxic dinoflagellates *Alexandrium catenella*, *A. fundyense* and *A. tamarense* which have potent neurotoxin, such as gonyautoxin or saxitoxin, cause the outbreak of paralytic shellfish poisoning (PSP) in the world. These organisms are identified on the basis of only their fine morphological features of their thecal plates. The morphological taxonomy of these organisms, however, remains controversial, because these features easily change depending on environmental conditions as well as the growth stages in a clonal culture.

In order to resolve the taxonomic debate and define genetic markers useful for classifying these organisms, we analyzed nuclear-encoded ribosomal DNA, especially the internal transcribed spacer (ITS) regions containing the 5.8S rDNA gene, since the nucleotide sequences of ITSs are thought to be less conserved than those of the small and large rRNA genes.

Here we describe the results of ITS sequence comparison in several species of *Alexandrium* and a possibility of the molecular identification of these species using these ITS sequences. Furthermore we tried to prepare monoclonal antibodies specific to cell surface antigens of *Alexandrium*, analyze the grouping of these species using these antibodies and compare the result of molecular identification by the DNA sequence comparison and by the monoclonal antibodies. Then these antibodies were applied to field samples which were collected from Japanese coastal waters. The results obtained in this study are described below:

(1) The DNA extraction and purification method from cells of *Alexandrium* species was established. ITS and 5.8S rDNA regions in 30 strains of seven species were amplified by a polymerase chain reaction (PCR) method using total DNA as a template. These products were analyzed by the restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. The RFLP analysis detected seven ITS-types among strains studied in this paper. Therefore, this result suggests that the 5.8S rDNA and flanking ITS regions provide useful taxonomic and genetic markers in *Alexandrium* species.

(2) The phylogenetic tree of these species showed that there are seven divergent ITS-types among six species of *Alexandrium* in this

study. These ITS-types sometimes did not agree with "morpho-species", for instance; an isolate of *A. fundyense* from the U.S.A. belongs to the same branch as nine Japanese isolates of *A. tamarense* (*A. tamarense* type) except for a strain of *A. tamarense* WKS-1; a strain WKS-1 from Kushimoto in Wakayama Prefecture or a strain CU-15(*A. tamarense*) from Thailand forms different branches from branch of *A. tamarense* type; and *A. tamarense* CU-1 from Thailand belongs to the same branch as *A. affine* from Japan. ITS-types of other isolates corresponded with "morpho-species".

(3) The analysis of these sequences also showed that the variation in the 3' end of ITS1 region was low within species but extremely high at inter-species level. We, therefore, prepared fluorescein-conjugated DNA probes at this hypervariable region and analyzed the reactivity of these probes to various strains of *Alexandrium* using a fluorescein *in situ* hybridization (FISH) method. The results showed that species specific signal was detected using these DNA probes.

(4) Ten monoclonal antibodies specific to cell surface antigens of *Alexandrium* species were prepared.

(5) The immunological grouping which was obtained by analyzing the reactivity of these antibodies to cultures of *Alexandrium* almost corresponded to the results of the molecular phylogenetic tree obtained by the DNA sequence comparison.

(6) These antibodies could be applied to field samples containing the algae of genus *Alexandrium* from Japanese coastal waters. The reactivity of these antibodies to cells from field samples, however, seems to be a little bit different from that to cells which are cultivated in our laboratory. We need to re-analyze reactivity of cells cultivated in a situation more similar to that of a field.

From the results described above, we may conclude that it is possible to identify several species of *Alexandrium* by the comparison of their ITS and 5.8S rDNA regions. Furthermore, the DNA probes and antibodies will have high utility as general "tag" for toxic and nontoxic *Alexandrium* species.



本研究を終わるにあたり、終始ご懇篤なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました、京都大学農学部教授 石田祐三郎様、および同講師 左子芳彦様に深く感謝の意を表します。

また、*Alexandrium*属藻類に特異的なモノクローナル抗体作製時に、熱心にご指導いただき大変お世話になりました南西海区水産研究所 長崎慶三様に心よりお礼を申し上げます。

さらに、多くのご助言とご指導をしていただいた京都大学農学部助教授 内田有恒様、京都大学農学部助教授 今井一郎様、南西海区水産研究所 山口峰生様、釜山水産大学校 金昌勲様、福井県立大学助教授 広石伸互様、高知大学助教授深見公雄様、海洋バイオテクノロジー研究所 嶋田あつ弘様、同 半澤直人様、通産省工業技術院 澤山茂樹様および京都大学農学部助手 吉永郁男様に心からお礼申し上げます。

本藻のDNA抽出法確立の際に、お世話になりました京都大学農学部教授 常脇恒一郎様、同助手 宮下直彦様、また塩基配列の解析時に大変お世話になりました京都大学理学部理論生物物理学講座教授 宮田隆様、同 二河成男様、九州大学農学部助手 植田徹様および理化学研究所 宮島伸行様に深く感謝の意を表します。

*Alexandrium*属藻類培養株あるいは本藻を含む現場試料を分譲していただきました北里大学水産学部教授 児玉正昭様、同助教授 緒方武比古様、東北大学農学部助教授 大島泰克様、ウッズホール海洋研究所 D. M. Anderson様、ビゴ海洋研究所 B. Reguera様、南西海区水産研究所 山口峰生様、香川県赤潮研究所 吉松定昭様、和歌山県水産試験場 竹内照文様、岩手県水産試験場 菊池達也様、長崎県水産試験場 轟重敏様、愛知県水産試験場 石田様、また本藻培養株の一部を形態分類により同定していただいた東京大学農学部教授 福代康夫様に深く感謝いたします。

最後に、本研究を行うに際しご助力していただいた長田宏之君、村上朋大君をはじめとする研究室の皆様や諸先輩方に感謝します。

- Adachi, M., Sako, Y., Ishida, Y., Anderson, D. M., and Reguera, B. (1993a): Cross-reactivity of five monoclonal antibodies to various isolates of *Alexandrium*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 1807.
- Adachi, M., Sako, Y. and Ishida, Y. (1993b): The identification of conspecific dinoflagellates *Alexandrium tamarensis* from Japan and Thailand by monoclonal antibodies. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 327-332.
- Adachi, M., Sako, Y. and Ishida, Y. (1993c): Application of monoclonal antibodies to field samples of *Alexandrium* species. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 1171-1175.
- Alam, M. I., Hsu, C. P. and Shimizu, Y. (1979): Comparison of toxins in three isolates of *Gonyaulax tamarensis* (Dinophyceae) *J. Phycol.*, 15, 106-110.
- Anderson, D. M. and Wall, D. (1978): Potential importance of benthic cysts of *Gonyaulax tamarensis* and *G. excavata* in initiating toxic dinoflagellates blooms. *J. Phycol.*, 14, 224-234.
- Anderson, D. M. and Morel, F. M. (1979): The seeding of two red blooms by the germination of benthic *Gonyaulax tamarensis* hypnocysts. *Estuarine Coastal Mar. Sci.*, 8, 279-293.
- Anderson, D. M. (1980): Effects of temperature conditioning on development and germination of *Gonyaulax tamarensis* (Dinophyceae) hypnozygote. *J. Phycol.*, 16, 166-172.
- Anderson, D. M. (1993): Identification of harmful algal species using molecular probes. In the oral presentation of sixth international conference on Toxic Marine Phytoplankton.
- Appels, R. and Honeycutt, R. L. (1986): rDNA: evolution over a billion years. In Dutta S. K. [Ed.] *DNA Systematics*, Vol II. Plants CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, pp. 81-135.
- Bakker, F. T., Olsen, J. L., Stam, W. T. and van den Hoek, C. (1992): Biogeography *Cladophoropsis membranacea* (Chlorophyta) based on comparisons of nuclear rDNA ITS sequences. *J. Phycol.*, 28, 660-668.
- Balech, E. (1967): Dinoflagellados nuevos o interesantes del golfo de Mexico y Caribe. *Rev. Mus. Arg. Cienc. Nat. "Bernardino Rivadavia"*, Inst. Nac. Cienc. Nat., Hidrobiol., 2, 111.
- Balech, E. (1985): The genus *Alexandrium* or *Gonyaulax* of the *tamarensis* group. In *Toxic Dinoflagellates*. (D. M. Anderson et al. eds.), Elsevier, New York, pp. 33-38.
- Balech, E. (1989): Redescription of *Alexandrium minutum* Halim (Dinophyceae) type species of the genus *Alexandrium*. *Phycologia*, 28, 206-211.

- Balech, E. (1993): A short diagnostic description of *Alexandrium*. In Graneli, E., Sundstrom, B., Edler, L. and Anderson, D. M. [Eds.] Toxic Marine Phytoplankton, Elsevier, New York, pp. 77.
- Boer, M. D., Voorde, G. T., Ossendorp, F. A., Duijin, G. V., Bruning, P. F. and Tager, J. M. (1988): Stimulation *in vitro* of sensitized splenocytes for the germination of antigens specific hybridomas. in *In Vitro Immunization in Hybridoma Technology : Progress in Biotechnology*, Elsevier, Amsterdam, vol 5, pp. 59-69.
- Boss, B. D. (1984): An improved *in vitro* immunization procedure for the production of antibodies against neural and other antigens. *Brain Res.*, 291, 193-196.
- Cembella, A. D. and Taylor, F. J. R. (1985): Biochemical variability within the *Protogonyaulax tamarens*/*catenella* species complex. in Toxic Dinoflagellates (D. M. Anderson et al. eds.), Elsevier, New York, pp.55-60.
- Cembella, A. D. and Taylor, F. J. R. (1986): Electrophoretic variability within the *Protogonyaulax tamarens*/*catenella* species complex.: pyridine linked dehydrogenases. *Biochem. Syst. Ecol.*, 14, 311-321.
- Cembella, A. D., Sullivan, J. J., Boyer, G. L., Taylor, F. J. R. and Andersen, R. J. (1987): Variation in paralytic shellfish toxin composition within the *Protogonyaulax tamarens*/*catenella* species complex; red tide dinoflagellates. *Biochem. Syst. Ecol.*, 15, 171-186.
- Coleman, A. W., Suarez, A. and Goff, L. J. (1994): Molecular delineation of species and syngens in volvocacean green algae (Chlorophyta). *J. Phycol.*, 30, 80-90.
- Dahmus, M. E., Laybourn, P., and Borrebaeck, C. A. K. (1988): Production of monoclonal antibody against electrophoretically purified RNA polymerase II subunits using *in vitro* immunization. *Mol. Immun.*, 25, 997-1003.
- Destombe, C., Cembella, A. D., Murphy, C. A. and Ragan, M. A. (1992): Nucleotide sequence of the 18S ribosomal RNA genes from the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarens* (Gonyaulacales, Dinophyta). *Phycologia*, 31, 121-124.
- Doucette, G. J., Cembella, A. D. and Boyer, G. L. (1989): Cyst formation in red tide dinoflagellate *Alexandrium tamarens* (Dinophyceae): Effects of iron stress. *J. Phycol.*, 25, 721-731.
- Eardley, D. D., Sutton, C. W., Hempel, W. M., Reed, D. C. and Ebeling, A. W. (1990): Monoclonal antibodies specific for sulfated polysaccharides on the surface of *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae). *J. Phycol.*, 26, 54-62.
- 福代康夫(1980):有毒プランクトン, “赤潮に関する近年の知見と研究の問題点” (赤潮研究会編集委員会編), 日本水産資源保護協会, 東京, pp.46-53.

- Fukuyo, Y., Yoshida, K. and Inoue, H. (1985): *Protogonyaulax* in Japanese coastal waters. in Toxic Dinoflagellates (D. M. Anderson et al. eds.), Elsevier, New York, pp.11-25.
- 福代康夫(1985):貝毒プランクトン—生物学と生態学 (水産学シリーズ56), 恒星社厚生閣, pp.125.
- Fukuyo, Y. (1985): Morphology of *Protogonyaulax tamarens* (Lehour) TAYLOR and *Protogonyaulax catenella* (Whedon and Kofoid) TAYLOR from Japanese coastal waters. *Bull. Mar. Sci.*, 37, 529-537.
- Fukuyo, Y., Pholpunthin, P. and Yoshida, K. (1988): *Protogonyaulax* (Dinophyceae) in the Gulf of Thailand. *Bull. Plankton. Soc. Japan*, 35, 9-20.
- Grief, C., O'Neil, M. A. and Shou, P. J. (1987): The zygote cell wall of *Chlamydomonas reinhardtii*: a structural, chemical and immunological approach. *Planta*, 170, 433-445.
- Hallegraeff, G. M. (1993): A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32, 79-99.
- Hallegraeff, G. M., Steffensen, D. A. and Wetherbee, R. (1988): Three estuarine Australian dinoflagellates that can produce paralytic shellfish toxins. *J. Plankton Res.*, 10, 533-541.
- Hamada, S. and Slade, H. D. (1980): Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, 44, 331.
- 長谷川 政美 (1993): 古細菌の進化的位置と真核生物の起源 蛋白質・核酸・酵素, 38, 1546-1555.
- Hayhome, B. A., Anderson, D. M., Kulis, D. M. and Whitten, D. J. (1989): Variation among congeneric dinoflagellate from the northeastern United States and Canada. *Mar. Biol.*, 101, 427-435..
- Hillis, D. M., Moritz, C., Porter, C. A. and Baker, R. J. (1991): Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science (Wash. D. C.)*, 251, 308-310.
- Hiroishi, S., Uchida, A., Nagasaki, K. and Ishida, Y. (1988): A new method for identification of inter- and intra-species of red tide algae *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina* (Raphidophyceae) by means of monoclonal antibodies. *J. Phycol.*, 24, 442-444.
- Horiguchi, T. (1983): Life History and Taxonomy of Benthic Dinoflagellates (Pyrrhophyta). Ph. D. thesis, University of Tsukuba, Japan, pp. 141.
- Ichimura, T. (1985): Geographic distribution and isolating mechanisms in the *Closterium ehrenbergii* species complex (Chlorophyceae, Closteriaceae). In Hara, H. [Ed.] Origin and Evolution of Diversity in plant communities. Academia Scientific Book Co., Tokyo,



市村輝宣(1986):ミカズキモの生活環を制御する内的外的因子の解析, 有性生殖を行う藻類の種個体群における生活環制御様式と種の分化,昭和58年度科学研究費補助金研究成果報告書, pp.1-9.

岩崎辰雄・安藤民衛・市川かおる・保井孝太郎.(1983):単クローン抗体,ハイブリドーマとELISA., pp.73-83.

岩手県水試(1993):平成4年度 貝毒安全対策事業報告書, 新種プランクトン等による貝類毒化機構解明調査, 平成5年3月, pp1-81.

Jones, J. L., Callow, J. A. and Green, J. R.(1988): Monoclonal antibodies to sperm surface antigens of the brown alga *Fucus serratus* exhibit region-, gamete-, species- and genus-preferential binding. *Planta*, 176, 298-306.

Jukes, T. H. and Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In Munro, H. N. ed. *Mammalian protein metabolism*, Academic Press, New York, pp. 21-132

Kamei, Y., Potey, J. L., Yoshimizu, M., Kimura, T., Yamada, K., Shirahata, S. and Murakami, H. (1990): Characterization of antigens of salmonid viruses with monoclonal antibodies. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 64, 163-170.

Kato, H., Ota, F., Fukui, K. and Yagawa, K. (1986): Monoclonal antibody to *Streptococcus mutans* type e. cell wall polysaccharide antigen. *Infect. Immun.*, 52, 628-630.

Kim, C. H., Sako, Y. and Ishida, Y. (1993): Comparison of toxin composition between populations of *Alexandrium* spp. from geographically distant areas. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 641-646.

木村 資生(1984):分子進化学入門, 培風館

Kita, T. and Fukuyo, Y. (1988): Description of the Gonyaulacoid dinoflagellate *Alexandrium hiranoi* sp. nov. inhabiting tidepools on Japanese pacific coast. *Bull. Plancton Soc. Japan*, 35, 1-7.

清川進・菊池和夫(1975): サロマ湖に発生した *Gonyaulax* 属 2 種による赤潮について. 北水試月報, 32, 21-28.

Kooistra, W. H. C. F., Stam, W. T., Olsen, J. L. and van den Hoek, C. (1992): Biogeography of *Cladophoropsis membranacea* (Chlorophyta) based on comparisons of nuclear rDNA ITS sequences. *J. Phycol.*, 28, 660-668.

Khyse-anderson, J.(1983). *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 10, 3238.

Kodama, M., Ogata, T., Fukuyo, Y., Ishimaru, T., Pholpunthin, P., Wisessang, S., Saitanu, K., Paniikyakarn, V. and Piyakarnchana, T. (1987): Non-toxic strains

*Protogonyaulax tamarensis* (Lebour) TAYLOR (Dinophyceae) in the gulf Thailand. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 1491.

Kodama, M., Ogata, T., Fukuyo, Y., Ishimaru, T., Wisessang, S., Saitanu, K., Paniikyakarn, V. and Piyakarnchana, T. (1988): *Protogonyaulax cohorticula*, a toxic dinoflagellate found in the gulf of Thailand. *Toxicon*, 26, 707-712.

Köhler, G. and Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (Lond.)*, 256, 495-497.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)*, 227, 680-685.

Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L. and Pace, N. R. (1985): Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 6955-6959.

Lebour, M. V. (1925): The dinoflagellates of Northern Seas. *Marine Biol. Ass. U.K. Plymouth*, 95, 14.

Loeblich, A. R. III and Loeblich, L. A. (1979): The systematics of *Gonyaulax* with special reference to the toxic species. in *Toxic Dinoflagellate Blooms* (Taylor, D. L. and Seliger, H. H. eds.), Elsevier, North Holland, pp. 41-46.

根井 正利 (1990): 分子進化遺伝学 培風館

Liu, Y. G., Mori, N. and Tsunewaki, K. (1990): Restriction fragment length polymorphism (RFLPs) analysis in wheat. I. Genomic DNA library construction and RFLP analysis in common wheat. *Jpn. J. Genet.*, 65, 367-380.

Luben, R. A. and Mohler, M. A. (1980): *In vitro* immunization as an adjunct to the production of hybridomas producing antibodies against the lymphokine osteoclast activity factor. *Mol. Immunol.*, 17, 635-639.

Mayr, E. (1982): The growth of biological thought: diversity, evolution and inheritance. *Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts*, pp. 273.

Montresor, M., Marino, D., Zingone, A. and Dafnis, G. (1990): Three *Alexandrium* species from coastal tyrrhenian waters (Mediterranean sea). in *Toxic Marine Phytoplankton* (E. Graneli et al. eds.), Elsevier, New York, pp. 78-81.

Nagasaki, K., Uchida, A., and Ishida, Y. (1991): A monoclonal antibody which recognized the cell surface of red tide alga *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 1211-1214.

西川藤吉 (1900): 赤潮に就て 動雑, 12, 127-133.



- O' Donnell, K. (1992): Ribosomal DNA internal transcribed spacer regions are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (Gibberell pulicaris). *Curr. Genet.* 22, 213-220.
- 緒方武比古・児玉正昭・藤井太郎・P. Pholpunthin・福代康夫.(1989):相模湾における有毒渦鞭毛藻 *A. cohorticula* の存在.  
平成元年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 534, pp.125.
- Olsen, G. J., Woese, C. R. and Overbeek, R. (1994): The winds of (Evolution) change: Breathing new life into Microbiology. *J. Bacteriol.*, 176, 1-6.
- Oshima, Y., Hayakawa, T., Hashimoto, M., Kotaki, Y. and Yasumoto, T. (1982): Classification of *Protogonyaulax tamarens* from northern Japan into three strains by toxin composition. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, 48, 851-854.
- Ota, F., Kato, H. and Fukui, K. (1987): Immunological study of cross-reactive polysaccharide antigen (types a, d and h) of oral *Streptococcus* spp. with monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, 55, 266-268.
- Peer, Y. V., Neefs, J.-M., Rijk, P. D. and Wachter, R. D. (1993): Reconstructing evolution from eukaryotic Small-Ribosomal-Subunit RNA sequences: Calibration of the Molecular clock. *J. Mol. Evol.*, 37, 221-232.
- Plumb, J. A. and Klesius, P. (1988): An assessment of the antigenic homogeneity of *Edwardsiella ictaluri* using monoclonal antibody. *J. Fish Disease*, 11, 499-509.
- Robert, L. P., Richard, C. B., George, W. P. and John, R. D. (1983): Production of monoclonal antibodies against calmodulin by *in vitro* immunization of spleen cells. *J. Cell. Biol.*, 96, 1149-1154.
- Rowan, R. and Powers, D. A. (1991): Molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 71, 65-73.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425.
- Sako, Y., Kim, C. H., Ninomiya, H., Adachi, M. and Ishida, Y. (1990): Isozyme and cross analysis of mating populations in the *Alexandrium catenella/tamarens* species complex. in *Toxic Marine Phytoplankton* (E. Graneli et al. eds.), Elsevier, New York, pp.320-323.
- Sako, Y., Adachi, M. and Ishida, Y. (1993): Preparation and characterization of monoclonal antibodies to *Alexandrium* species. In Smayda, T. J. and Shimizu, Y. [Eds.] *Toxic Phytoplankton Bloom in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 87-93.
- 左子 芳彦、足立 真佐雄、石田 祐三郎 5・アイソザイム, モノクローナル抗体法による微細藻の識別・微生物生態学の新たな展開と手法, 学会出版センター, pp61-78.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Vols. 1-3.
- Schantz, E. J., Lynch, J. M., Vayvada, G., Matsumoto, K. and Rapoport, H. (1966): The purification and characterization of the poison produced by *Gonyaulax catenella* in axenic culture. *Biochemistry*, 5, 1191-1195.
- Scholin, C. A. and Anderson, D. M. (1993): Population analysis of toxic and nontoxic *Alexandrium* species using ribosomal RNA signature sequences. In Smayda, T. J. and Shimizu, Y. [Eds.] *Toxic Phytoplankton Bloom in the Sea*. Elsevier, Amsterdam, pp. 95-102.
- Scholin, C. A. and Anderson, D. M. and Sogin, M. L. (1993): Two distinct small subunit ribosomal RNA gene in the North American toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, 29, 209-216.
- Smith, G. P. (1974): Unequal cross over and the evolution of multigene families. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 38, 507-513.
- Steane, D. A., McClure, B. A., Clarke, A. E. and Kraft, G. T. (1991): Amplification of the polymorphic 5.8S rRNA gene from selected Australian *Gigartinales* species (Rhodophyta) by polymerase chain reaction. *J. Phycol.*, 27, 758-762.
- Steindinger, K. L. (1983): A re-evolution of toxic dinoflagellate biology and ecology. *Progr. Phycol. Res.*, 2, 147-188.
- Steindinger, K. L. and Moestrup, O. (1990): The taxonomy of *Gonyaulax*, *Pyrodinium*, *Alexandrium*, *Gessenerium*, *Protogonyaulax* and *Goniodoma*. in *Toxic Marine Phytoplankton* (E. Graneli et al. eds.), Elsevier, New York, pp.522-523.
- 水産庁・福岡県・佐賀県・熊本県・鹿児島県・宮崎県(1982):昭和56年度九州海域赤潮予察調査報告書(西海ブロック),昭和57年3月, pp.307.
- Taylor, F. J. R. (1979): The toxigenic gonyaulacoid dinoflagellates. in *Toxic Dinoflagellate Blooms* (Taylor, D. L. and Seliger, H. H. eds.), Elsevier, North Holland, pp.47-65.
- Taylor, F. J. R. (1984): Toxic dinoflagellates: Taxonomic and biogeographic aspects with emphasis on *Protogonyaulax*. in *Seafood Toxins* (Ragelis, E. P., ed.), ACS symposium series 262, American Chemical Society, Washington, pp.77-97.
- Uchida, A., Nagasaki, K., Hiroishi, S. and Ishida, Y. (1989): The application of monoclonal antibodies to an identification of *Chattonella marina* and *Chattonella antiqua*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 721-725.
- Vrieling, E. G., Draijer, Arie., van Zeijl, W. J. M. and Peperzak, L., Gieskes, W. W. C. and Veenhuis, M. (1993): The effect of labeling intensity, estimated by real-time confocal

laser scanning microscopy, on flow cytometric appearance and identification of immunochemically labeled marine dinoflagellates. J. Phycol., 29, 180-188.

Vrieling, E. G., Peperzak, L., Gieskes, W. W. C., Veenhuis, M. (1994): Detection of the ichthyotoxic dinoflagellate *Gyrodinium (cf.) aureolum* and morphologically related *Gymnodinium* species using monoclonal antibodies: a specific immunological tool. Mar. Ecol. Prog. Ser., 103, 165-174.

Ward, D. M., Bateson, M. M., Weller, R. and Ruff-Roberts, A. L. (1992): Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. In Marshall, K. C. [Ed.] Advances in MICROBIAL ECOLOGY, Plenum Press, New York, pp. 219-288.

Whedon, W. F. and Kofoed, C. A. (1936): Dinoflagellata of the San Diego region, 1. On the skeletal morphology of two new species, *Gonyaulax catenella* and *G. acatenella*. Univ. Calif. Publ. Zool., 41, 25-31.

White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. and Taylor, J. W. (1990): Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal genes. In Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. [Eds.] PCR Protocols. Academic Press, New York, pp. 315-322

吉松定昭(1981):培養による *Protogonyaulax catenella* の有性生殖 I. 異株接合. 日本プランクトン学会報, 28, 131-139.

吉松定昭(1984):培養による *Protogonyaulax catenella* の有性生殖 II. 交配型の決定. 日本プランクトン学会報, 31, 107-111.

Yuki, K. and Yoshimatu, S. (1990): New record of *Alexandrium insuetum* Balech (Dinophyceae) from Japan with some supplementary observations on thecal morphology. Bull. Plankton Soc. Japan, 36, 120-126.

Yuki, K. and Fukuyo, Y. (1992): *Alexandrium satoanum* sp. nov. (Dinophyceae) from Matoya Bay, central Japan. J. Phycol., 28, 395-399.

## 《著者関連文献》

Sako, Y., Kim, C. H., Ninomiya, H., Adachi, M. and Ishida, Y. (1990): Isozyme and cross analysis of mating populations in the *Alexandrium catenella/tamarensis* species complex. in Toxic Marine Phytoplankton (E. Graneli et al. eds.), Elsevier, New York, pp. 320-323.

Sako, Y., Adachi, M. and Ishida, Y. (1993): Preparation and characterization of monoclonal antibodies to *Alexandrium* species. In Smayda, T. J. and Shimizu, Y. [Eds.] Toxic Phytoplankton Bloom in the Sea. Elsevier, Amsterdam, pp. 87-93.

左子 芳彦、足立 真佐雄、石田 祐三郎 5・アイソザイム, モノクローナル抗体法による微細藻の識別・微生物生態学の新たな展開と手法, 学会出版センター, pp61-78.

Adachi, M., Sako, Y., Ishida, Y., Anderson, D. M., and Reguera, B. (1993a): Cross-reactivity of five monoclonal antibodies to various isolates of *Alexandrium*. Nippon Suisan Gakkaishi, 59, 1807.

Adachi, M., Sako, Y. and Ishida, Y. (1993b): The identification of conspecific dinoflagellates *Alexandrium tamarensis* from Japan and Thailand by monoclonal antibodies. Nippon Suisan Gakkaishi, 59, 327-332.

Adachi, M., Sako, Y. and Ishida, Y. (1993c): Application of monoclonal antibodies to field samples of *Alexandrium* species. Nippon Suisan Gakkaishi, 59, 1171-1175.

Adachi, M., Sako, Y., Ishida, Y. (1994): Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae). J. Phycol., 30, in press

Adachi, M., Sako, Y., Ishida, Y.: DNA signatures specific for the toxic and nontoxic *Alexandrium* species. In the Proceeding of Sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton. in press.